

ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BIOLOGIQUES

Section : MICROBIOLOGIE ET APPLICATIONS A LA BIOLOGIE

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR **E. DUCLAUX**

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

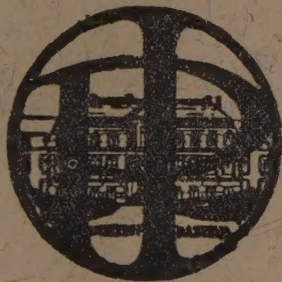
A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, L. MARTIN, G. RAMON,
J. TREFOUËL,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.



PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e)

SOMMAIRE DES N^{os} 7-8

	Pages.
Caractères physiologiques différentiels de deux variantes S et R de <i>Proteus vulgaris</i> , par MADELEINE MOREL	225
Sur certains caractères de la croissance en voile des bacilles acido-résistants, par J. BRETEY, J. BROWAËYS, et D. DERVICHIAN	233
Les modalités du phénomène de Koch au cours de la période allergique de la tuberculose du cobaye, par P. GASTINEL et H. BROCARD	240
Recherche du bacille de Koch dans les expectoration, les liquides pleuraux et les liquides du tubage par la méthode de moussage-essorage, par L. CRUVEILHIER, M. FAGUET et N. GRANDJEAN	246
Sensibilité de <i>Pasteurella avicida</i> à l'action bactéricide des sulfamides par NICOLAS STAMATIN, VICTOR GEORGESCO et SERGIU LUSCALOV	250
Sur la protéine de la grasseur du ver à soie. III. Etude de certains de ces groupements libres, par PIERRE DESNUELLES et CHANG CHI TAN	264
Recherches sur le mécanisme de la réaction de Bordet-Wassermann, étude cinétique de la fixation du complément, par J. CHOUTEAU	273
Photomètre différentiel pour l'enregistrement automatique des courbes de multiplication bactérienne, par P. BONÉT-MAURY et R.-J. WALÉN	284
A propos du photomètre différentiel de MM. Bonét-Maury et Walén, par M. FAGUET	292
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1944, par R. BÉQUIGNON et CH. VIALAT	294

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 200 fr. (5 dollars 25).

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD et LÉOPOLD NÈGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin.* Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 50 fr. (1 dollar 15).

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 175 fr. (3 dollars 90).

ANDRÉ-R. PREVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 228 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1940 : 50 fr. (1 dollar 15).

MARGUERITE LWOFF. — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941 : 50 fr. (1 dollar 15).

L. NÈGRE et J. BRETEY. — Vaccination par le B. C. G. par scarifications cutanées. *Préface du professeur A. Marfan.* Un vol. de 104 pages avec 18 fig. (Collection Médecine et Chirurgie : Recherches et applications). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 25 fr.

L. JUSTIN-BESANÇON et A. LWOFF. — Vitamine antipellagreuse et avitaminoses nicotiniques. Un vol. de 288 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 90 fr.

MADELEINE MOREL. — L'acide nicotinique facteur de croissance pour « *Proteus vulgaris* » (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C^{ie} édit., Paris, 1943 : 65 fr.

ANDRÉ LWOFF, chef de Service à l'Institut Pasteur. — L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les Micro-organismes. Hermann et C^{ie}, édit., Paris, 1944 : 215 fr.

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1945

France et Colonies françaises : 240 fr.; Étranger : 340 fr..

Changement d'adresse : 5 fr.

Secrétariat, 25, rue du Dr Roux, Paris (XV^e).

Cette Revue constitue une des sections de
l'ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BIOLOGIQUES

Prix d'abonnement à l'ensemble des 26 Sections

France et Colonies : 4.150 Fr.

Étranger : Tarif I, 6.000 Fr.; Tarif II, 6.140 Fr.

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES DIFFÉRENTIELS DE DEUX VARIANTES S ET R DE *PROTEUS VULGARIS* (*)

par MADELEINE MOREL.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

Dans un travail précédent (M. Morel, 1943), étudiant le développement de *Proteus vulgaris* en fonction de la concentration en acide nicotinique du milieu de culture à l'aide de la technique de Lwoff et Querido, nous avons montré que la stabilité des réactions quantitatives d'une souche donnée à la vitamine PP est sous la dépendance des conditions de culture. La souche normale N (*Proteus vulgaris*, X 19 Syrie, de la collection de l'Institut Pasteur), entretenue à 37°, pendant cinq mois, a donné une variante P ayant un besoin plus élevé en acide nicotinique. Le développement de la souche P en présence d'une quantité donnée de cette vitamine est de 34 p. 100 inférieur à celui de la souche N. La souche P ainsi obtenue est stable. Rappelons également que le besoin en acide nicotinique des souches N et P est modifié de façon différente par l'addition au milieu de culture de sérum, de certains acides aminés et d'accepteurs d'hydrogène.

Au cours d'expériences ultérieures, nous avons eu l'occasion de constater que la souche P était autoagglutinable en solution saline même peu concentrée (2 p. 1.000 ClNa) alors que les suspensions de la souche N étaient parfaitement stables. Les cultures de la souche P, en milieu synthétique, c'est-à-dire fortement salin, ne

(*) Association des Microbiologistes de Langue Française, séance du 13 avril 1944.

présentent en général pas d'agglutination visible à l'œil nu, mais l'examen microscopique révèle cependant la présence de nombreux petits agrégats de bactéries.

Pour mesurer le besoin en acide nicotinique, nous avons déterminé, à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier, les densités optiques de cultures effectuées en présence d'une quantité donnée de vitamine PP ; la question se posait donc de savoir si cette densité optique était modifiée par la formation de grumeaux. Nous avons provoqué l'agglutination ménagée d'une suspension de *Proteus*, soit par le sérum spécifique, soit par l'acidification du milieu.

TABLEAU I. — Influence
de l'agglutination sur la densité optique de *Proteus vulgaris*.

5 C.C. DE CULTURE +	DENSITÉ (1) optique	ASPECT MICROSCOPIQUE
0	84	Bactéries isolées.
III gouttes Sérum 1/10 (2).	86	Très petits grumeaux.
V gouttes Sérum 1/10.	87	Grumeaux moyens
X gouttes Sérum 1/10.	86	Entièrement agglutiné en très gros amas.
X gouttes H ₂ O	97	Bactéries isolées.
X gouttes HCl N/100	104,5	Agglutination visible à l'œil nu
XX gouttes H ₂ O	89	Bactéries isolées.
XX gouttes HCl N/100	94	Très gros flocons

(1) Densité optique exprimée par la graduation de l'électrophotomètre de Meunier. Une division correspond à une variation de densité optique de 0,0035 pour une lumière filtrée de λ moyenne efficace de 0,55 μ environ.
(2) L'addition de sérum à 1 p. 10 dans le milieu n'entraîne pas de changement appréciable de la densité optique.

a) *Agglutination par le sérum spécifique.* — Une suspension dans l'eau physiologique d'une culture sur gélose de *Proteus* est répartie dans des tubes à essai, et additionnée de dilutions variables du sérum d'un lapin immunisé avec la souche correspondante. Les tubes sont placés à 0° pour éviter tout développement ; après six heures, les mesures de densité optique sont effectuées. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

b) *Agglutination acide.* — A 5 c.c. d'une suspension bactérienne dans l'eau bidistillée, on ajoute 0,5 c.c. et 1 c.c. d'HCl N/100, 0,55 c.c. et 1 c.c. d'eau bidistillée ; après quelques minutes, on mesure la densité optique (tableau I).

Les bactéries agglutinées par le sérum ou l'acide chlorhydrique se présentent sous forme de grumeaux qui, à l'examen microscopique, sont identiques à ceux montrés par la souche P en milieu synthétique. Nous voyons donc que la formation de grumeaux dans une suspension bactérienne homogène ne modifie que très

légèrement sa densité optique telle qu'on la mesure à l'électrophotomètre de Meunier, et que, dans tous les cas, celle-ci est augmentée de 3 à 7 p. 100. Donc, lorsque l'on étudie le développement de la souche P, il s'introduit dans les mesures une légère erreur par excès qui est de l'ordre de 5 p. 100. Les différences observées entre le développement des souches N et P en présence d'une même quantité de vitamine PP sont donc légèrement inférieures à celles qui existent réellement.

Il paraissait vraisemblable que la souche P autoagglutinable en eau physiologique était *rough*, la souche N étant *smooth* suivant la classification d'Arkwright. Nous avons donc étudié les différents caractères permettant de distinguer les souches R et S. Dans les milieux liquides (bouillon, milieu synthétique), les cultures de la souche N développent un trouble homogène, les cultures de la souche P ont tendance à décanter, mais cependant le milieu reste toujours trouble. Nous avons ensuite étudié la forme des colonies sur gélose. Pour obtenir des colonies isolées, il faut effectuer les étalements sur de la gélose très sèche. L'examen des colonies après dix-huit à vingt heures d'incubation à 28° nous a montré que :

a) Les colonies N sont petites, rondes, bombées, à bords nets et à surface lisse ; l'aspect de la plaque est très homogène, toutes les colonies semblent du même type ;

b) La plupart des colonies P sont d'un aspect très différent ; elles sont plates, beaucoup plus grandes, la surface est rugueuse et les bords très irréguliers. Cet aspect caractéristique est très marqué chez les colonies jeunes, il s'atténue dans les cultures plus âgées. Il existe aussi quelques colonies d'aspect voisin du type S, mais qui, une fois isolées, ont donné également des colonies du type R.

La souche P semblait bien présenter tous les caractères d'une souche R, la souche N ceux d'une souche S. Les recherches de Boivin et de ses collaborateurs ont montré que chez un grand nombre de bactéries se décolorant par la méthode de Gram (*Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*), l'aspect *smooth* des colonies va souvent de pair avec la présence d'une endotoxine de nature glucido-lipidique, tandis que l'aspect *rough* va de pair avec l'absence de cet antigène. Mais cette règle est sujette à des exceptions (Boivin et Mesrobianu), aussi ces auteurs ont-ils proposé de dévier les termes *rough* et *smooth* de leur sens primitif, les formes S étant par définition celles qui renferment de l'antigène glucido-lipidique, les formes R celles qui en manquent totalement, ceci quel que soit l'aspect des colonies.

L. Mesrobianu a trouvé de l'antigène complet chez diverses souches de *Proteus vulgaris*, et depuis, Ciuca, Mesrobianu, Badenski et Munteanu ont montré que celui-ci était chez *Proteus* X 19 le

facteur responsable de la réaction de Weil-Felix. Nous avons extrait l'antigène glucido-lipidique de nos deux souches suivant la méthode décrite par Boivin, Mesrobeanu et Mesrobeanu. Nous avons pu constater ainsi que l'extrait trichloracétique de la souche N était fortement opalescent, alors que celui de la souche P était parfaitement limpide. On voit donc que la souche N d'aspect lisse possède un antigène glucido-lipidique complet alors que la souche P *rough* en est dépourvue ou n'en renferme que des quantités négligeables. Nous avons préparé des lapins avec les deux souches N et P suivant les deux techniques suivantes :

a) Les animaux reçoivent deux injections sous-cutanées de bactéries tuées par la chaleur, puis deux injections sous-cutanées de bactéries vivantes et une dernière injection intrapéritonéale de bactéries vivantes.

b) Toutes les injections sont effectuées avec des bactéries chauffées pendant une heure à 75°, les quatre premières étant sous-cutanées et la dernière intrapéritonéale. Les lapins ont été saignés dix jours après la dernière injection.

Les extraits trichloracétiques N et P, une fois neutralisés, précipitent avec les sérums, homologue et hétérologue, préparés suivant l'une ou l'autre technique. Ceci peut s'expliquer si l'on suppose que la souche N possède à côté du complexe glucido-lipidique une certaine quantité de haptène polysaccharidique libre, et que la souche P, dépourvue d'antigène complet, possède cependant une faible quantité de ce glucide, ou d'un glucide voisin permettant l'existence de réactions croisées ; à moins que, suivant l'hypothèse que nous avons émise, cette souche P ne possède une très faible quantité d'antigène glucido-lipidique. Des expériences actuellement en cours nous fixeront sur la valeur de cette hypothèse. Nous voyons que les caractères d'auto-agglutinabilité et l'aspect des colonies sont chez *Proteus vulgaris* liés à la structure antigénique des deux souches étudiées (1).

Notons en passant que les souches N et P précipitent toutes deux sous l'action du réactif de Millon ou de la trypaflavine à 1 p. 500. Dans ce cas particulier, ces réactifs ne peuvent pas être utilisés pour différencier les souches R et S.

Au cours de recherches toutes différentes sur l'activité antimicrobienne de certains extraits bactériens, nous avons été amenée, utilisant comme test *Proteus vulgaris*, à examiner le rôle inhibiteur bien connu de l'oléate de sodium. Au centre d'une boîte de Petriensemencée de façon homogène avec la souche N, on dépose une parcelle d'oléate de sodium. Après vingt-quatre heures d'incubation, on constate autour de l'oléate un halo de 1 cm. environ

(1) Nous remercions M. P. GRABAR de l'aide qu'il nous a apportée au cours de ces recherches.

de diamètre dans lequel aucune colonie ne s'est développée. Si l'on effectue la même expérience avec la souche P, il se développe des colonies jusqu'au contact des parcelles d'oléate.

TABLEAU II. — Comparaison des deux souches N (= S) et P (= R) de *Proteus vulgaris*.

	N Smooth	P Rough
Densité optique de cultures effectuées (1) en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 c.c.	66	43,2
Hydrolysât de sérum (0,5 p. 100)	0	+ 34 p. 100 (2)
Mélange acides aminés (20 p. 100)	+ 39 p. 100	+ 65 p. 100
<i>l</i> -isoleucine	0	+ 34 p. 100
Acide aspartique <i>d-l</i>	0	+ 23 p. 100
NO ₃ K (0,1 p. 100)	+ 30 p. 100	+ 42 p. 100
Aspect des colonies.	Lisse.	Rugueux.
Autoagglutinabilité	0	++
Antigène glucido-lipidique	++	0
Sensibilité à l'oléate de sodium	+	0

(1) Les chiffres correspondent à la densité optique de cultures effectuées suivant la technique de Lwoff et Querido.
 (2) Les chiffres représentent le pourcentage d'augmentation de la densité optique, obtenu par addition au milieu de culture des différentes substances indiquées. Pour des précisions sur les conditions de ces mesures se reporter à notre précédent travail (M. Morel, 1943).

On voit que la souche P (= R) de *Proteus vulgaris* est insensible à l'action de l'oléate dans les conditions de l'expérience alors que la souche N (= S) y est sensible. L'antigène complet est un constituant pondéralement très important, situé à la surface de la bactérie ; il contient des groupements de nature lipidique, on est donc conduit à se demander s'il ne jouerait pas le rôle de récepteur vis-à-vis de l'oléate. Mais la présence d'un antigène glucido-lipidique ne suffit pas à conférer la sensibilité à l'oléate de sodium ; la forme S de *Salmonella typhi murium*, pas plus que la forme R, n'est sensible à cette substance. Il conviendra d'étudier un grand nombre de cas particuliers avant de tirer une conclusion générale de ces expériences. Le comportement des formes R et S de *Proteus vulgaris* n'en est pas moins très suggestif.

Discussion.

La transformation irréversible N → P induite chez *Proteus vulgaris* par culture prolongée à 37° est donc une transformation S → R. La forme N (S) possède un antigène glucido-lipidique, la forme P (R) en est dépourvue (ou n'en renferme qu'une quantité

infime). Le séjour à 37° a donc entraîné la perte du pouvoir de synthétiser cet antigène, c'est-à-dire vraisemblablement la perte du ou des enzymes responsables de cette synthèse, qu'il s'agisse soit de la combinaison du glucide et du lipide, soit de la synthèse de l'un ou de l'autre des constituants de l'antigène. P. Bordet a décrit un *coli* qui est S à 37° et R à 20° et chez lequel tout se passe comme si la synthèse de l'antigène glucido-lipidique était possible à 37° et non à 20°. Dans le cas du *Proteus*, la température élevée ne conditionne pas le fonctionnement de l'enzyme (encore hypothétique) mais entraîne sa disparition.

Nous avons montré que la forme N (S) a besoin de moins de nicotinamide que la forme P (R). On sait que le besoin en acide nicotinique de *Proteus* augmente quand l'oxygénation du milieu diminue (Lwoff et Querido). L'augmentation du besoin observé avec la souche P ne pourrait-elle pas s'expliquer par une oxygénation moins bonne des bactéries réunies en grumeaux ? Ceci ne nous paraît guère vraisemblable, d'une part parce que les grumeaux sont petits et peu nombreux, d'autre part parce qu'il existe d'autres différences dans le métabolisme de ces souches. Le besoin en acide nicotinique est modifié de façon différente par addition de nitrate et d'acides aminés. Il existe une relation évidente entre le métabolisme et le besoin en acide nicotinique et il semble bien que les formes N (S) et P (R) diffèrent réellement par leur métabolisme et leur besoin en acide nicotinique, le changement du besoin en vitamine PP étant une conséquence de la modification du métabolisme. Tout se passe comme s'il existait une relation entre la perte de l'antigène glucido-lipidique et le changement du métabolisme soit que l'un des phénomènes soit sous la dépendance de l'autre, soit que tous deux dépendent d'un facteur commun.

Plusieurs auteurs (Ciurea, Boivin) ont étudié comparativement le métabolisme des formes R et S de quelques bactéries sans réussir à mettre en évidence des différences significatives. Il est cependant vraisemblable qu'une perturbation aussi importante que la disparition de l'antigène glucido-lipidique doive être accompagnée de changements du métabolisme. Ceci n'est nullement en contradiction avec le fait que l'on ne peut pas mettre en évidence de modifications de certaines fonctions comme la respiration.

Rappelons ici que lorsque la souche S (= N) est entretenue à 38° pendant dix jours son besoin en acide nicotinique augmente notablement ; mais après un séjour de douze jours à 28°, ce besoin est redevenu normal. Au contraire, après culture prolongée (cinq mois et demi) à 38° le besoin en acide nicotinique reste élevé, la transformation est donc à ce moment irréversible (M. Morel 1943). On peut supposer qu'après un court séjour à 38° une partie seulement des germes a subi la transformation S → R. Par culture

à 28°, les germes S prendraient le dessus sur les germes R. Si cette interprétation est correcte, ceci équivaut à dire qu'en milieu synthétique, à 28°, la forme S a une vitesse de multiplication plus élevée que la forme R.

CONCLUSIONS

Nous avons utilisé dans le présent travail deux souches de *Proteus vulgaris*, N et P, ayant des besoins différents en acide nicotinique. Ces besoins en acide nicotinique sont également modifiés de façon différente par l'addition au milieu de culture de sérum, d'acides aminés et d'accepteurs d'hydrogène. Nous avons pu mettre en évidence chez ces deux souches les caractères suivants :

1° La souche N donne sur gélose des colonies petites, rondes et bombées, à surface lisse et à bords nets ; elle n'est pas autoagglutinable en eau physiologique et enfin, elle possède de l'antigène glucido-lipidique.

2° La souche P donne sur gélose des colonies plus étendues, plates, à surface rugueuse et à bords dentelés ; elle est autoagglutinable en eau physiologique ; elle ne possède pas — ou très peu — d'antigène glucido-lipidique.

3° La souche N est *smooth* alors que la souche P est *rough*.

4° Les cultures effectuées avec la souche P en milieu synthétique fortement salin sont partiellement agglutinées. La formation d'agréats dans une suspension bactérienne ne modifie que très faiblement la densité optique mesurée à l'électrophotomètre de Meunier et toujours en l'augmentant (de 5 p. 100 environ); les différences observées dans le besoin en acide nicotinique des deux souches N et P sont donc des valeurs minima.

5° La souche étudiée précédemment sous la dénomination de P est donc la variante *rough* de la souche N qui est *smooth*. Il existe ainsi entre les deux variantes S (N) et R (P) d'une même souche de *Proteus vulgaris* des différences dans le besoin en acide nicotinique et dans l'action du sérum, des nitrates et des acides aminés sur ce besoin.

6° Les deux souches N (= S) et P (= R) précipitent sous l'action du réactif de Millon et de la trypaflavine.

7° Seule la souche N (= S) est sensible à l'action inhibitrice de l'oléate de sodium, à l'exclusion de la souche P (= R).

8° Les deux variantes S et R de *Proteus vulgaris* présentent donc des différences importantes du métabolisme.

BIBLIOGRAPHIE

- ARKWRIGHT (J. A.). *J. Path. a. Bact.*, 1921, **24**, 36.
BOIVIN (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 7.

- BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 652 ; *Rev. Immunol.*, 1937, **3**, 319.
- BOIVIN (A.), MESROBEANU (L.) et MESROBEANU (I.). *Arch. roum. Path. exp. et microb.*, 1935, **8**, 45.
- BORDET (P.). *Bull. Ac. Roy. Méd. Belgique*, 1941, **6**, 258.
- CIUCA (M.), MESROBEANU (L.), BADENSKI (A.) et MUNTEANU (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1414.
- CIUREA (C. I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 22.
- LWOFF (A.) et QUERIDO (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1039.
- MESROBEANU (L.). Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries. *Thèse de la Faculté des Sciences de Strasbourg*. Masson, édit., Paris, 1936.
- MEUNIER (P.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **29**, 113.
- MOREL (M.). L'acide nicotinique, facteur de croissance pour *Proteus vulgaris*. *Monographie de l'Institut Pasteur*. Masson, édit., Paris, 1943.

SUR CERTAINS CARACTÈRES DE LA CROISSANCE EN VOILE DES BACILLES ACIDO-RÉSISTANTS (*)

par J. BRETEY, J. BROWAEYS et D. DERVICHIAN.

(Institut Pasteur, Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

Afin de pouvoir suivre, sous le contrôle même du microscope, la croissance des bacilles tuberculeux et paratuberculeux, nous avons été amenés à étudier la façon dont ces microbes forment un voile à la surface des milieux liquides tels que celui de Sauton.

Les recherches préliminaires ont été faites avec le bacille paratuberculeux de la fléole. Si l'on examine au fond noir des fragments de voile de ce microbe, on voit que les éléments sont groupés selon deux types principaux. Le plus souvent ils sont au contact les uns des autres, formant des nervures épaisses dans lesquelles il est impossible de discerner les contours cellulaires du fait de la réfringence et du voile général qui réduit les contrastes, même dans les parties peu denses. Parfois cependant les éléments sont en chaînettes de bacilles placées bout à bout, chacune isolée de la voisine et l'ensemble formant un voile très mince (fig. 1). La première disposition était sans intérêt pour l'étude que nous envisagions, alors que la seconde nous permettait de suivre dans d'excellentes conditions optiques, ce qui se passe au niveau de chaque microbe. Comme nous ne l'obtenions que très irrégulièrement, nous avons voulu déterminer les conditions de son apparition.

Deux points particuliers nous ont tout de suite frappés à l'examen de ces voiles minces : Les bacilles, même s'ils sont isolés, ne présentent pas le moindre mouvement brownien. De plus, les chaînettes qu'ils forment se disposent d'une façon telle qu'elles sont séparées les unes des autres par un intervalle sensiblement constant, et cela sur la totalité de la surface du voile. Il en résulte une disposition très élégante en arabesques ou en labyrinthe.

Ces deux constatations nous ont fait penser qu'il est vraisemblable que si les éléments microbiens ne se disposent pas n'im-

(*) Association des Microbiologistes de Langue Française, séance du 4 mai 1944.

porte comment à la surface du milieu, c'est qu'ils sont unis entre eux par une membrane très ténue, issue des bacilles. Mais la minceur de ce voile est telle qu'il échappe aux conditions normales d'observation. On peut cependant avoir de nouvelles preuves de son existence si on le brise et observe les mouvements dont sont animés les fragments. La comparaison ne saurait être mieux faite qu'avec la dérive de glaçons provenant d'une banquise. Si on observe un voile présentant l'aspect que nous venons de décrire, une légère agitation brise celui-ci. On a ainsi des frag-



FIG. 1.

ments formés chacun de plusieurs éléments de chainettes. A l'intérieur de chaque fragment les bacilles, qu'ils soient isolés ou en chainettes, gardent les mêmes rapports entre eux. Ces fragments s'entrechoquent avec les voisins, exactement comme le feraient des glaçons au moment de la débâcle. Ils sont limités en général, non pas par les éléments microbiens, mais par un film invisible dont on est bien obligé d'admettre la présence par la façon dont se produisent les heurts entre fragments : il n'arrive pratiquement jamais que des bacilles appartenant à deux fragments entrent en contact ; le heurt se produit avant. Dans certaines conditions enfin, lorsque le milieu de culture contient de fines particules en suspension et lorsqu'on met très soigneusement au point, on peut voir ces particules animées d'un mouvement brownien très intense et entraînées par le courant entre les chenaux qui entourent les frag-

ments : ceux-ci sont optiquement vides. On voit alors que le contour du fragment débordé de toutes parts le contour des bacilles.

L'ensemble de ces différentes constatations matérialise donc pour le bacille de la fléole, et dans ces conditions particulières de croissance, l'existence d'un film très mince reliant les éléments les uns aux autres.

Pour concrétiser d'autre façon et étudier cette couche, nous avons essayé des techniques inspirées de celles qui sont couramment utilisées dans l'observation des couches monomoléculaires.

Nous avons lavé très minutieusement notre verrerie par le mélange sulfochromique concentré suivi d'un long rinçage à l'eau courante. Les objets étaient tenus par des pinces pour éviter le contact des doigts. La stérilisation était obtenue par flambage *extérieur* au bec Bunsen. La surface du liquide d'ensemencement était nettoyée comme dans les cuves de Langmuir par la technique habituelle d'essuyage des couches monomoléculaires contrôlée par du talc stérile. Le milieu était ensuite stérilisé par exposition aux rayons ultra-violet. Cette stérilisation, qui pourrait être superflue dans le cas de microbes à croissance rapide, est nécessaire pour les bacilles paratuberculeux à multiplication relativement lente et le serait bien plus encore pour le bacille tuberculeux.

Sur des cuves ou des cristallisoirs préparés de cette façon, on était réalisée une interface air-liquide aussi débarrassée d'impuretés qu'il était possible de le faire, nous avons procédé aux essais suivants.

L'ensemencement à la température ordinaire d'un fragment de voile contenant à la fois des nervures et du voile mince (fig. 2) permet de constater dès les minutes qui suivent que le voile se fragmente plus ou moins et qu'il s'éparpille spontanément à la moindre agitation sur toute la surface d'un ballon ou même sur une grande partie d'une cuve de 20 x 30 cm. de côté. Sur un ballon qui n'a pas été soumis à ce traitement, on n'observe rien de tel : le fragment ensemencé reste cohérent et groupé. Ces phénomènes sont parfaitement visibles à l'œil nu. Mais si on les suit au microscope, on voit que ce sont les fragments de voile mince compris entre les nervures qui s'éparpillent, réalisant la « débâcle glaciaire » que nous avons décrite plus haut, alors que l'aspect des nervures ne se modifie pas, même après douze heures d'observation. Les constatations sont en tous points identiques si les ensemencements sont faits sur des milieux maintenus à 56° et à 96° : les nervures ne subissent aucune tendance à la fragmentation et à l'éparpillement, alors qu'on obtient facilement leur désagrégation avec l'huile de paraffine, le benzène et le xylol.

Si l'ensemencement est fait à 37° sur une surface de milieu de 20 x 30 cm. nettoyée rigoureusement, on constate quinze heures plus tard qu'un voile recouvre la totalité de la cuve d'une façon

absolument régulière et cohérente. Le phénomène peut être suivi en ensemençant sur une surface préalablement talquée. Au bout du temps nécessaire à la croissance, le talc est retrouvé repoussé et tassé dans les coins de la cuve, tout le reste de la surface étant occupé par le voile. Il ne semble pas que cet accroissement en surface, extraordinaire dans le cas du bacille de la fièvre car il correspond à une aire quinze ou vingt fois plus grande que celle qui est couverte dans les conditions habituelles, corresponde à une vitesse de division plus rapide. Il faut le mettre sur le compte d'un étalement non gêné du voile mince. L'examen de la limite entre

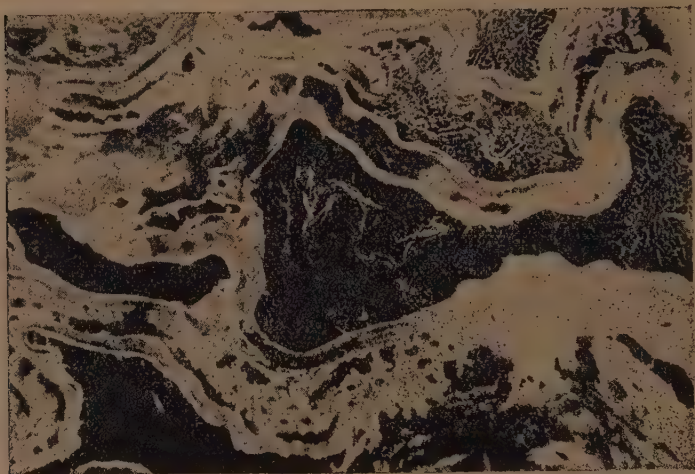


FIG. 2.

le talc et le voile montre que celui-ci arrive presque au contact du talc, épousant sensiblement toutes les sinuosités de la masse refoulée. Il suffit de déposer une gouttelette de trioléine à la surface soigneusement nettoyée du milieu pour empêcher l'extension du voile qui se développe alors comme dans les conditions ordinaires (fig. 3).

Il en est de même si l'on forme à la surface un film de protéines, que celles-ci proviennent du bacille de la fièvre lui-même (culture de trois jours) ou du BCG (culture de quinze jours). A cet effet, du milieu est soutiré à un ballon portant une culture en voile. Cette solution est déposée goutte à goutte à la pipette sur la surface parfaitement nettoyée du milieu. Il reste à la surface une couche sensiblement monomoléculaire de protéines (pour faciliter l'étalement des gouttes, on ajoute à la solution 4 p. 1.000 d'alcool amylique). Le retard dans l'étalement du voile est moindre que dans le

cas de la trioléine : l'étalement atteint les 75 p. 100 de ce qu'il aurait été sans le film de protéines. Il semble donc que dans les conditions ordinaires où l'extension du voile de fléole se fait lentement, celle-ci puisse encore être ralentie par les protéines qui passent dans le milieu et qui sont adsorbées à la surface.

Nous avons réalisé une petite cuve de Langmuir de 12 cm. de long sur 4 de large dont le fond en verre permettait l'examen sous le microscope et au fond noir. L'ensemencement était fait avec quelques centimètres carrés d'un voile mince présentant l'aspect en arabesque. On pouvait le comprimer au moyen d'une bandelette-

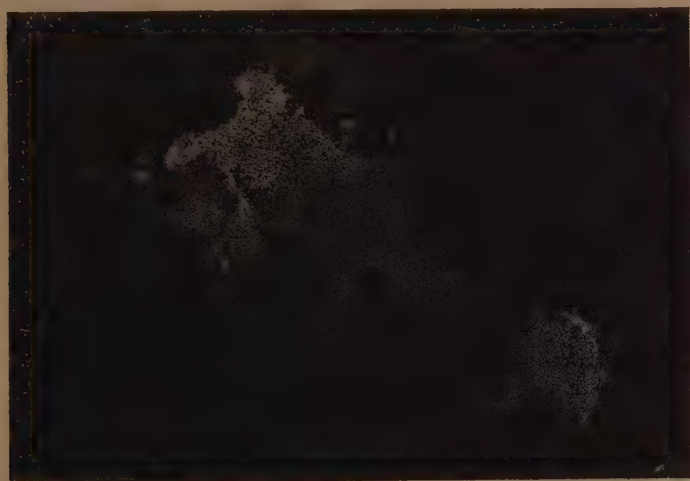


FIG. 3.

piston en verre paraffiné, glissant sur les parois. Il ne se passe rien tant que la bandelette n'arrive pas au contact de la culture, ce qui montre bien que le film ne s'étend pas à une grande distance des bacilles. Il en est de même si le voile, au lieu d'être déposé tout formé à la surface de la cuve, s'est développé sur place pendant les quelques heures qui ont suivi son ensemencement. Lorsqu'on continue à rapprocher la bandelette de verre de la paroi opposée, on voit dans un premier temps que les chaînettes de bacilles commencent à se rapprocher les unes des autres, mais d'une façon régulière et d'une valeur équivalente en tous les points de la surface du voile, que ce soit près ou loin du piston qui le comprime. Le film est donc compressible. Il est en outre élastique, car si on recule le piston, tout revient à l'état initial. Mais cette élasticité est faible car si on continue la compression, on constate dans un second temps qu'il se forme des

plis, analogues en tous points à ceux que l'on obtiendrait en poussant le bord libre d'un tapis vers le centre. Ils sont approximativement perpendiculaires à la direction de la force qui les a produits. Mais cette seconde phase n'est plus réversible : les plissements persistent lorsqu'on retire la bandelette. Ils sont macroscopiquement analogues à ceux qui apparaissent sur le voile d'une culture qui a recouvert toute la surface qui lui est offerte. Ils sont, par contre, totalement différents des nervures épaisses et



FIG. 4.

denses, formées de bacilles tassés. La formation de celles-ci paraît relever d'un tout autre mécanisme.

Au lieu de comprimer le voile en poussant la bandelette-piston, on obtient le même effet de compression, tout au moins jusqu'à la formation des plis exclusivement, en déposant une gouttelette de trioléine à la surface. Mais le phénomène est instantané et ses détails ne peuvent être suivis.

Nous avons fait des recherches analogues sur d'autres bacilles acido-résistants : d'une part sur des souches à colonies lisses : Bac. aviaire 80, humaine Aguirre, Bac. de la tortue et, d'autre part, sur des souches rugueuses : BCG, humaines n^{os} 239, 266 et 514. Dans chacun des deux groupes, les souches se sont comportées de façon analogue, de sorte que la description peut être commune pour chaque groupe.

Souches à colonies lisses. (Bac. Aviaire 80, humaine Aguirre, Bac. de la tortue).

Alors que l'ensemencement sur un milieu ordinaire donne l'extension lente du voile, l'ensemencement sur une surface de milieu parfaitement propre donne le même éparpillement que pour la fléole dans les mêmes conditions.

C'est ainsi qu'après deux jours de culture, nous avons observé que $\frac{1}{4}$ de la surface est couverte dans le premier cas, alors que dans le second cas toute la surface est recouverte d'une culture plus ou moins homogène. A l'examen au fond noir, les bacilles ne présentent pas de mouvement brownien. Les déplacements des fragments de voile se font dans les mêmes conditions que pour le bacille de la fléole, les bacilles gardant leurs rapports respectifs à l'intérieur de chaque fragment. Cependant, il y a une différence essentielle : les bacilles sont disposés non plus en chaînettes régulièrement espacées, mais tout à fait au hasard (fig. 4), isolés en général, alors que pour les cultures sur surface non spécialement nettoyée les bacilles restent le plus souvent en amas rappelant des images d'agglutination.

Souches à colonies rugueuses (BCG, humaines nos 239, 266 et 514).

Les voilesensemencés ne se composaient ici que de nervures à bacilles tassés, présentant une grande cohérence ; jamais nous n'avons observé de voiles minces analogues à ceux de la fléole. Nous espérons les obtenir par ensemencement sur surfaces nettoyées. Sur celles-ci la semence se fragmente et s'éparpille, mais ces fragments restent très massifs, et continuent leur croissance sous cette forme exclusivement.

Ainsi donc, alors que les souches rugueuses ne peuvent guère s'étaler sur une interface propre, poussent en travées et en nervures, sans donner de voile mince où les bacilles soient côte à côte, les souches lisses au contraire s'étalent admirablement et ne donnent pas de travées ou nervures. La disposition des éléments paraît due uniquement au hasard.

Le bacille de la fléole constitue un cas tout à fait particulier. Il peut donner les deux aspects de voile : épais ou mince. Ce dernier est obtenu à coup sûr avec une surface rigoureusement propre et il présente la propriété curieuse de permettre un alignement très particulier des bacilles en chaînettes équidistantes.

LES MODALITÉS DU PHÉNOMÈNE DE KOCH
— AU COURS —
DE LA PÉRIODE ALLERGIQUE DE LA TUBERCULOSE
DU COBAYE (*)

par P. GASTINEL et H. BROCARD.

(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Paris.)

Le déterminisme du phénomène de Koch a été précisé quand Bezançon et de Serbonnes montrèrent que ce mode réactionnel du cobaye à la surinfection tuberculeuse ne survient que lorsque l'animal a une tuberculose datant d'un certain temps et si la dose de bacilles réinjectés est suffisante. Les réinoculations faites trop tôt donnent des lésions du type de la primo-infection et ne s'en écartent que par une évolution plus raccourcie. Un peu plus tard, mais avant le moment où l'animal réagit selon le phénomène de Koch, peut s'observer un mélange des deux phénomènes, le « phénomène mixte » de Bezançon et de Serbonnes.

A la suite de leurs expériences, Debré et Bonnet schématisèrent ces résultats en considérant que l'apparition de la sensibilité tuberculinique précédait de peu le moment où l'animal allait commencer à réagir aux réinoculations selon le phénomène de Koch.

Les études ultérieures, notamment celles de Krause et Peters, de Boquet, de Corper, Damerow et Cohn, ont minutieusement envisagé les lésions obtenues en réinoculant régulièrement à des cobayes de faibles doses de bacilles ; on constate alors la diminution progressive du nodule de réinoculation allant jusqu'à disparition presque complète de tout phénomène réactionnel, mettant bien en évidence ainsi un état d'immunité de surinfection.

Mais il était à se demander comment réagit l'animal lorsqu'on répète chez lui, longtemps après la constitution de l'état de sensibilité tuberculinique, des injections de fortes doses de bacilles, capables de déclencher le phénomène de Koch. Dans ce but, nous avons, sur un grand nombre d'animaux approximativement de même poids, ayant subi une première inoculation de 0,01 mg. de

(*) Note présentée à la séance du 2 mars 1944 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

bacilles humains, répété les réinoculations à des intervalles variant de une semaine à deux mois en employant toujours la voie intra-dermique et en injectant une quantité de bacilles de même souche, variant entre 0,1 mg. et 1 mg. La durée de l'expérimentation a varié selon la survie de l'animal ; elle a parfois atteint huit mois.

Le comportement de nos animaux a été très variable. Nous en schématisons les éventualités que nous illustrerons de quelques exemples. Précisons tout de suite que nous réservons l'appellation de phénomène de Koch aux cas répondant, selon la description classique, à l'infiltration avec escarre, survenant en deux à trois jours, suivie de la chute de la plaque nécrosée et de la guérison de la lésion qui ne s'accompagne à aucun moment d'abcédation.

1° *Persistance du phénomène de Koch* : Chez quelques animaux, rares à vrai dire, les réinoculations ont toujours été suivies de phénomène de Koch typique :

Cobaye 37-97 : Inoculation le 16 février. Intradermo + à la tuberculine le 5 mars. Réinoculations : le 16 mars, le 24 mars et le 7 avril, de 0,1 mg., escarre typique ; le 3 mai de 0,02 mg., escarre typique. Mort le 27 mai. Chaque fois de très beaux phénomènes de Koch ont été observés.

2° *Atténuation du phénomène de Koch pouvant aller jusqu'à sa disparition* : C'est une éventualité plus fréquente.

Cobaye 37-68 : Inoculation le 16 février. Intradermo + à la tuberculine le 5 mars. Réinoculations : le 16 mars et le 24 mars, de 0,1 mg., escarre typique ; le 7 avril, de 0,1 mg., escarre typique mais plus petite ; le 3 mai de 0,02 mg., infiltration avec point escarrotique ; le 26 mai de 0,1 mg., infiltration sans escarre. Mort le 1^{er} juin.

Chez l'animal suivant on assiste, non plus à une régression progressive, mais à une disparition brusque du phénomène de Koch.

Cobaye 11 : Inoculation le 8 juin. Intradermo + à la tuberculine le 12 juillet. Réinoculations : le 12 juillet de 0,1 mg., petite infiltration à point escarrotique ; le 19 juillet de 0,4 mg., escarre typique ; le 30 juillet de 1 mg. et de 0,5 mg., escarre typique ; le 28 août de 1 mg. et de 0,5 mg., infiltration minime sans processus escarrotique. Mort le 27 octobre.

Une telle disparition peut être définitive et cela bien avant le terme évolutif du processus tuberculeux. Ainsi dans le protocole ci-dessous, cinq mois avant la mort du cobaye, la réaction de réinoculation a cessé de se faire selon le type du phénomène de Koch, ce qui exclut toute possibilité de sa disparition pré-agonique.

Cobaye 37-81 : Inoculation le 12 janvier. Intradermo + à la tuberculine le 5 février. Réinoculations : le 16 mars et le 24 mars 0,1 mg., escarre typique ; le 7 avril de 0,1 mg., et le 3 mai de 0,02 mg., infiltration minime ; le 26 mai de 0,1 mg., petite infiltration ; le 8 juin de 0,1 mg., et le 12 juillet de 0,1 mg., le 19 juillet de 0,2 mg., infiltration minime ; le 30 juillet de 1 mg. et de 0,5 mg., le 28 août de 1 mg. et de 0,5 mg., petite papule avec croûte. Mort le 17 septembre.

3° *Irrégularité du phénomène de Koch* : Ici l'animal va présenter une aptitude assez curieuse et décevante, telle qu'il réagira alternativement aux réinoculations tantôt selon la modalité la plus schématique du phénomène de Koch, tantôt selon des formes dégradées se limitant à une simple infiltration, cela bien entendu en opérant toujours dans les mêmes conditions, notamment au point de vue de la dose. Les raisons de ces fluctuations nous échappent.

Cobaye 3 : Inoculations le 12 avril. Intradermo + à la tuberculine le 15 mai. Réinoculations : le 15 mai de 0,1 mg., escarre typique bien que peu étendue ; le 26 mai de 0,1 mg., absence à peu près totale de réaction ; le 8 juin de 0,1 mg., réaction pratiquement nulle ; le 12 juillet de 0,1 mg., infiltration légère avec croûte ; le 19 juillet de 0,2 mg., escarre typique ; le 30 juillet de 1 mg., de 0,5 mg. et de 0,1 mg., infiltration légèrement escarrotique ; le 28 août de 1 mg., de 0,5 mg., et 0,1 mg., infiltration minime avec croûte. Mort le 23 septembre.

Voici donc un animal qui a d'abord réagi à la réinoculation de bacilles par un phénomène de Koch parfaitement net, qui a ensuite perdu la possibilité de faire ce type réactionnel jusqu'à ne plus donner de manifestation perceptible, puis a présenté un très beau phénomène de Koch et a ultérieurement perdu ses facultés réactionnelles même pour des doses bien supérieures de bacilles de surinfection.

4° *Abcès et phénomène mixte* : Ce mode de réaction à la réinoculation survient dans des circonstances très variables.

Tantôt l'animal, après avoir réagi selon un phénomène de Koch typique, donnera aux réinoculations subséquentes soit une réaction seulement atténuée, soit un petit abcès contenant des bacilles tuberculeux pour offrir encore un phénomène de Koch très caractéristique lors de nouvelles investigations.

Cobaye 14 : Inoculation le 8 juin. Intradermo + à la tuberculine le 10 juillet. Réinoculations : le 12 juillet de 0,1 mg., infiltration à point escarrotique ; le 19 juillet, de 0,4 mg., escarre assez nette ; le 30 juillet de 1 mg. et de 0,5 mg., escarre typique ; le 28 août de 1 mg. et de 0,5 mg., grosse infiltration avec petite escarre ; le 11 octobre de 1 mg. et de 0,5 mg., petite infiltration avec escarre minime ; le 3 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., abcès ; le 23 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg.,

le 21 décembre de 1 mg. et 0,5 mg., le 7 janvier de 1 mg. et de 0,5 mg., escarre typique. Survie le 1^{er} février.

D'autres fois, après avoir donné un phénomène typique, les animaux réagissent toujours suivant le mode abcédé.

Cobaye 21 : Inoculation le 9 août. Intradermo + à la tuberculine le 21 octobre. Réinoculations : le 21 octobre de 1 mg. et de 0,5 mg., escarre typique ; le 3 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., le 23 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., le 21 décembre de 1 mg. et de 0,5 mg., le 7 janvier de 1 mg. et de 0,5 mg., phénomène mixte. Survie le 1^{er} février.

Certains animaux réagissent presque d'emblée par la réaction abcédée et gardent ce type de réponse :

Cobaye 16 : Inoculation le 21 juillet. Intradermo + à la tuberculine le 21 octobre. Réinoculations : le 21 octobre de 1 mg. et de 0,5 mg., infiltration avec croûte ; le 3 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., le 23 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., le 21 décembre de 1 mg. et de 0,5 mg., abcès ; le 7 janvier de 1 mg. et de 0,5 mg., phénomène mixte. Survie le 1^{er} février.

Exceptionnellement enfin, des cobayes peuvent ne donner que la réaction abcédée ou au maximum répondent par le phénomène mixte :

Cobaye 22 : Inoculation le 21 juillet. Intradermo + à la tuberculine le 21 octobre. Réinoculations : le 1 octobre de 1 mg. et de 0,5 mg., le 3 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., abcès ; le 23 novembre de 1 mg. et de 0,5 mg., phénomène mixte ; le 21 décembre de 1 mg. et de 0,5 mg., abcès ; le 7 janvier de 1 mg. et de 0,5 mg., phénomène mixte. Survie le 1^{er} février.

Dans l'ensemble, nous avons obtenu les réactions suivantes :

Phénomène de Koch typique, marqué par l'escarre précoce et sa chute sans aucune formation de pus.

Infiltration avec croûte, réalisant un phénomène de Koch en miniature, selon l'expression de Boquet.

Infiltration minime, pouvant aller jusqu'à une absence à peu près totale de réaction.

Abcès précoce, apparaissant dès le lendemain, contenant des bacilles tuberculeux à l'exclusion de tout autre germe et se cicatrisant en moins d'une semaine.

Phénomène mixte, constitué par un abcès du type précédent, mais surmonté d'une croûte escarrotique.

On pourrait se demander si les différences dans les réactions obtenues ne sont pas sous la dépendance des variations dans la

dose de bacilles injectés. Nous avons constaté en fait que les réponses aux doses comprises entre 1 mg. et 0,1 mg. que nous avons utilisées ne diffèrent que par leur intensité, mais sont en règle du même ordre. Certes la dose de bacilles ayant été généralement appréciée à la spatule, l'erreur dans sa détermination n'est pas négligeable, mais les expériences de contrôle, dans lesquelles nous avons pesé les bacilles, n'ont pas donné de résultats différents.

On pourrait penser que la répétition des réinjections de bacilles a amené la désensibilisation artificielle du cobaye. Cette hypothèse semble bien devoir être exclue. Nous avons en effet maints exemples d'animaux ne donnant plus de phénomène de Koch et le présentant ensuite lors de nouvelles investigations. D'autre part, il est remarquable que chez certains cobayes dès la seconde ou la troisième réinoculation disparaît l'aptitude réactionnelle spéciale.

Témoin le cobaye 37-99, inoculé le 12 février, qui fait un phénomène de Koch le 16 mars et le 24 mars et ne donne pratiquement plus rien le 7 avril aux mêmes doses ; les cobayes 1 et 2, qui, inoculés le 12 avril, donnent une réaction nette le 15 mai, légère le 26 mai et pratiquement nulle le 8 juin.

Un problème qui mérite beaucoup plus d'être discuté est constitué par les relations entre les réactions cutanées de l'animal aux bacilles et à la tuberculine. Autrement dit, on pourrait penser que l'intensité ou l'absence du phénomène de Koch sont conditionnées par l'aptitude de l'animal à réagir à la tuberculine. Or, ayant presque toujours pratiqué en même temps que les réinoculations de bacilles des injections intra-dermiques de 1 cg. de tuberculine, nous n'avons point constaté de relation absolument constante.

Par exemple le cobaye 37-97, inoculé le 12 février, réagit toujours aux réinoculations (le 16 mars, le 24 mars, le 7 avril et le 3 mai) selon le mode du phénomène de Koch et donne en même temps toujours une forte intra-dermo-réaction à la tuberculine, gardant une sensibilité telle qu'on le trouve mort le 27 mai d'une hémopéritoine le lendemain d'une injection de 1 cgr. de tuberculine.

Au contraire, le cobaye 3, dont nous avons rapporté le protocole et dont les réactions à l'injection de bacilles étaient très inconstantes, souvent même pratiquement nulles, donnait toujours des intra-dermo-réactions fortement positives à la tuberculine.

Il apparaît bien par conséquent que les réactions à la tuberculine et aux bacilles qui sont parfois de types tellement superposables qu'il serait à penser que leur mécanisme est identique, ne traduisent point dans de mêmes conditions la sensibilité de l'organisme à la même substance. Si on réfléchit à la dose minime de

tuberculine que peut contenir 0,1 mg. de corps bacillaires, on conclut volontiers qu'il faut sans doute invoquer aussi l'action de substances constitutives du germe agissant sur l'organisme sensible.

Quoi qu'il en soit, il résulte de nos expériences que le schéma selon lequel, à partir du moment où l'animal est entré dans la période allergique, il réagit aux inoculations fortes de bacilles par un phénomène de Koch, ne peut être maintenu sous une forme trop absolue. Ce mode de réponse est inconstant. L'animal peut donner le phénomène, puis ne plus l'offrir et éventuellement le présenter à nouveau, sans que les raisons de ces fluctuations nous apparaissent actuellement.

Il en est de même de la conception selon laquelle l'abcès précoce est une réaction propre à la période où se crée l'état allergique. Nous avons vu ce mode réactionnel survenir tardivement chez des cobayes qui avaient eu des phénomènes typiques et persister jusqu'à leur mort. Rappelons à cet égard que Bezançon et de Serbonnes avaient noté incidemment que de vieux cobayes tuberculeux, ayant déjà présenté le phénomène de Koch, pouvaient répondre à la réinoculation non par de la nécrose, mais à nouveau par un abcès.

En somme nos expériences montrent que dans la réponse à la réinoculation de bacilles tuberculeux, une dissociation peut être opérée. Le phénomène de Koch représente à la fois une réaction d'hypersensibilité de type tuberculinique, marquée par les phénomènes cutanés ecchymotiques et nécrotiques, et une réaction d'immunité, caractérisée par la non-évolution de la tuberculose de réinfection. La première est inconstante, peut disparaître, sans qu'on puisse dire que cette perte de la réaction cutanée soit le résultat d'une désensibilisation artificielle ou soit parallèle à l'extinction de la réactivité tuberculinique. Au contraire, le phénomène immunitaire a persisté toujours dans nos constatations, se traduisant dans les cas où n'existait pas le phénomène de Koch par une simple infiltration régressive sans évolution ulcéreuse ou encore par l'abcès d'apparition précoce et de cicatrisation rapide.

Ces divers types de réactions traduisent tous l'existence d'un état d'allergie, si on ne limite pas cette appellation à l'hypersensibilité cutanée, mais si on lui laisse le sens originel donné par von Pirquet. On peut dire par conséquent que les animaux, quels que soient les aspects variables de leur comportement à la réinoculation, restent en état d'allergie. Si l'aspect immunitaire apparaît constamment lors de la surinfection, beaucoup plus variable est au contraire l'aspect d'hypersensibilité tégumentaire. Ces faits contribuent à montrer combien il est dangereux de juger de l'allergie par la seule réponse à l'injection intra-dermique ou cutanée de tuberculine.

**RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH
DANS LES EXPECTORATIONS,
LES LIQUIDES PLEURAUX
ET LES LIQUIDES DE TUBAGE
PAR LA MÉTHODE DE MOUSSAGE-ESSORAGE (*)**

par L. CRUVEILHIER, M. FAGUET et N. GRANDJEAN.

Nous avons eu recours à la méthode du moussage-essorage pour la recherche du bacille tuberculeux, soit dans les expectorations, soit dans les liquides pleuraux, soit encore dans des liquides de tubage.

Nous n'avons pu encore nous procurer de liquide céphalo-rachidien et nous réservons pour une prochaine communication la recherche du bacille tuberculeux dans les urines, qui présente, à notre sens, un intérêt tout particulier. Qu'il s'agisse d'expectoration, de liquide pleural ou de liquide de tubage, nous avons utilisé la méthode de moussage-essorage décrite par MM. Abribat et Dognon. Leur technique, nous le rappelons, fait suite aux travaux de Zavidsky, Ramsden, Benson, J. Perrin, Dubrisay, etc...

Abribat (1) a donné la première technique de moussage-essorage basée sur l'essorage que certaines mousses peuvent subir sous l'action de la pesanteur.

Courrier et Dognon (2) l'ont appliquée avec succès dans leurs recherches sur la concentration des substances gonadotropes contenues dans l'urine de femmes enceintes, puis Dognon et Dumontet (3) dans la concentration des bacilles tuberculeux contenus dans une solution.

La technique que nous avons adoptée est celle décrite par Abribat et Dognon. Nous avons utilisé un tube très simple comme le préconise Dognon (4) pour l'étude des micro-organismes, nécessitant une stérilisation à température élevée (250°), néces-

(*) Note présentée à la séance du 2 mars 1944 de l'Association des Microbiologistes de Langue française.

(1) M. ABRIBAT, *C. R. Ac. Sci.*, 1939, 209, 244 ; *Act. Sc. Ind.*, 1942, 932, 123.

(2) R. COURRIER et A. DOGNON, *C. R. Ac. Sci.*, 1939, 209, 242.

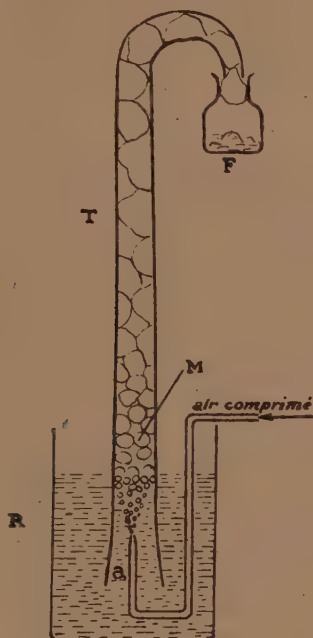
(3) A. DOGNON et H. DUMONTET, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, 884.

(4) A. DOGNON, *Act. Sc. Ind.*, 1942, 932, 157.

saire pour la destruction des germes. Ce tube a le grand avantage de ne comporter aucun joint de caoutchouc.

Le courant d'air comprimé divisé en bulles aussi petites que possible est amené par un simple tube de verre effilé comme l'indique la figure 1. Ce tube est en relation par l'intermédiaire d'un détendeur avec une source d'air comprimé.

Nous pratiquons d'abord l'homogénéisation des crachats par la



méthode habituelle, puis on neutralise par l'acide chlorhydrique (5). Nous diluons dans l'eau de façon à obtenir 250 c. c. On porte à 40° et on ajoute une certaine quantité de gélatine portée à la même température. La quantité de gélatine varie suivant les conditions d'homogénéisation de 2 à 4 c. c. par 250 c. c. de mélange. On place l'ensemble dans un vase au préalable stérilisé à 250°. On refroidit jusqu'à 18° et on pratique le moussage.

Dans quelques cas particuliers nous avons dû ajouter des traces d'alcool ou d'acétone afin d'accroître la rigidité des interfaces liquide-gaz et, par là même, la stabilité de la mousse

(5) On a d'ailleurs intérêt à se rapprocher du point isoélectrique de la gélatine.

obtenue. Ainsi qu'Abribat l'a montré, la mousse ne doit pas être prélevée aussitôt après sa formation. Il faut lui laisser le temps de s'essorer sous l'effet de la pesanteur. Le liquide qu'elle a entraîné redescend dans la solution à travers laquelle on continue à faire passer le courant gazeux. On obtient bientôt un équilibre déterminé par la nature du liquide, la hauteur de l'appareil et la pression utilisée. Une fois cet équilibre atteint et conservé pendant un certain temps, on règle la pression pour faire sortir du tube les différentes portions de la colonne de mousse ainsi essorée. Ce sont ces différentes portions que nous examinons sur lame après coloration par la méthode de Ziehl.

*
* *

Les sujets auxquels nous nous sommes adressés étaient tous entachés de tuberculose à divers titres. Depuis plus ou moins longtemps, la recherche du bacille tuberculeux avait été chez eux à diverses reprises, *négative, même après homogénéisation* et souvent même *après un enrichissement*. Nous avons joué la difficulté puisque les prélèvements sur lesquels nous avons opéré nous ont été fournis dans les laboratoires d'hôpital de MM. Troisième, Pruvost, Bourgeois et H. Bénard. Ces laboratoires sont en effet réputés à juste titre pour leur direction éclairée et le soin compétent qui est apporté aux diverses recherches qui y sont pratiquées. 55 examens nous ont été confiés dont 34 expectorations — la recherche du bacille tuberculeux a été positive vingt et une fois dont quinze fois pour les expectorations.

Nous ne retiendrons des nombreuses observations qu'il nous a été donné de faire que quelques-unes qui nous sont apparues particulièrement démonstratives.

Une malade, âgée de trente-quatre ans, chez laquelle un pneumothorax artificiel avait été pratiqué, alors qu'après enrichissement on avait trouvé de très rares bacilles tuberculeux, entre à l'hôpital le 25 janvier. On ne trouve pas de bacilles dans l'expectoration. L'examen est répété quinze jours et un mois après. Il reste négatif malgré l'homogénéisation. Sur la demande qui nous est faite, nous employons la méthode du moussage-essorage. Nous arrivons alors à mettre en évidence des bacilles tuberculeux en grande quantité.

Un malade de vingt-sept ans ayant subi une thoracoplastie il y a quelques années, fait une rechute au cours de laquelle on arrive à grand-peine, après enrichissement, à déceler la présence d'un seul bacille. On répète pendant plus de deux mois, mais vainement, les examens en vue de la recherche du bacille tuberculeux. Ils sont toujours négatifs même après homogénéisation, même aussi après enrichissement.

Un moussage-essorage est pratiqué ; on décèle aussitôt de nombreux bacilles tuberculeux.

Une jeune fille de vingt ans, chez laquelle une intervention extra-pleurale avait été pratiquée le 23 juillet 1943, entre à l'hôpital. L'examen de son expectoration est jugé nécessaire. Il est pratiqué après homogénéisation et enrichissement. On procède même au tubage. Par trois fois les résultats sont négatifs. La méthode du moussage-essorage permet, au contraire, de mettre en évidence de nombreux bacilles tuberculeux.

Tout dernièrement, nous avons été priés de rechercher par la méthode du moussage-essorage, la présence de bacilles tuberculeux dans l'expectoration d'une infirmière française venant de séjourner à Fresnes. Cette infirmière, blessée au poumon durant la grande guerre de 1914-1918, ayant fait de violents accès de fièvre sans raisons apparentes, on avait soupçonné la tuberculose et pratiqué une radiographie restée négative, comme furent négatifs les divers examens de laboratoire pratiqués à Fresnes et dans un hôpital parisien. Nous avons pu déceler, dans l'expectoration de cette malade, des bacilles tuberculeux en assez grand nombre.

A notre demande, dans un des services d'hôpital précités, on a bien voulu partager en deux parties égales trois homogénéisations provenant de trois malades différents. Une moitié de chacune de ces homogénéisations nous a été confiée alors que l'autre moitié était conservée par le laboratoire d'hôpital. Alors que par les méthodes habituelles appliquées cependant avec toute la rigueur et la persistance qui sont de coutume dans le laboratoire dont il s'agit, aucun bacille tuberculeux n'a pu être trouvé. Nous avons réussi à en déceler un grand nombre dans chacune des expectorations par la méthode du moussage-essorage.

De ces diverses constatations, nous croyons être en droit de conclure que la méthode du moussage-essorage peut être d'une réelle utilité dans la recherche du bacille tuberculeux, soit dans les expectorations, soit dans les liquides pleuraux, soit dans les liquides de tubage.

Cette méthode est d'un emploi simple et précis, elle permet de donner rapidement des résultats concluants.

SENSIBILITÉ DE *PASTEURELLA AVICIDA* A L'ACTION BACTÉRICIDE DES SULFAMIDES

par NICOLAS STAMATIN, VICTOR GEORGESCO et SERGIU LUSCALOV.

Les infections provoquées chez nos animaux par les germes du groupe *Pasteurella* n'ont pas été étudiées à fond du point de vue de leur traitement par les Sulfamides.

C. Levaditi et L. Reinié, en 1938, ont essayé quatre produits sulfamidés : 1° *p.* aminophénylsulfamide à la dose de 0,02 g. pour 20 g. de souris ; 2° 4 nitro 4' aminodiphénylsulfone à la dose de 0,005 g. ; 3° 4 nitro 4' aminodiphénylsulfoxyde à la dose de 0,05 g. et 4° 4' sulfamido 2-4 diamino-azobenzène à la dose de 0,01 g.

En traitant avec ces produits des souris infectées avec une souche de *P. avicida*, qui à la dose de 0,3 c. c. d'une dilution à 10^{-5} , les tue en dix-sept à vingt-quatre heures, ces auteurs n'obtinrent qu'un certain retard de la mort. Le 4 nitro, 4' aminodiphénylsulfone sauve une souris sur dix. Chez les poules, le produit le plus actif fut le *p.* aminophénylsulfamide, qui sauva deux poules sur six infectées par une souche de virulence moyenne.

Levaditi et Vaisman (1938) admettent que les sulfamides ont une action antiendotoxique. Une dose d'endotoxine provenant d'une souche de *P. avicida*, mortelle pour les témoins, est bien supportée par les souris sulfamidées. Les souris qui ont ainsi résisté seraient immunisées et supporteraient une dose de culture de *P. avicida* mortelle pour les témoins.

D. M. Cardoso, J. Reis et P. Nobrega, en 1939, ont étudié l'action préventive du Septoplix dans l'infection expérimentale à *P. avicida* chez la poule. Ils utilisent des poulets de race Leghorn, du poids de 400 à 600 g. L'infection est obtenue par voie intramusculaire à des doses variant de 0,1 c. c. à 0,001 c. c. d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures de souches récemment isolées. Le Sulfamide est administré par la même voie en suspension huileuse à des doses variant de 0,4 à 0,8 g. 78 p. 100 des poulets infectés à la dose de 0,001 c. c. de culture et qui reçoivent simultanément 0,8 g. de Sulfamide survivent ; dans les mêmes conditions, mais en réduisant la dose de Sulfamide à 0,4 g., il n'en résiste que 20 p. 100. Les infections faites par des doses plus fortes de cultures, 0,01 et surtout 0,1 c. c. sont, en général, mortelles. Les poules qui résistent après l'infection et le traitement au Sulfamide ont acquis une immunité contre la *P. avicida*.

En 1942, N. Bontscheff a fait une série d'expériences sur l'action de *p. aminophénylsulfamidothiazol* (Cibazol) et du *p. aminophénylsulfamidopyrine* (Eubasinum), sur la *P. avicida* *in vitro* et *in vivo*. Il constate que sur la gélose, ainsi que dans du bouillon, les deux Sulfamides ajoutés à raison de 10,5 et 3 p. 100 empêchent toute multiplication, même si on ensemence des grandes quantités de culture — de 0,25 à 1,5 pour 5 c. c. de bouillon. La concentration de 1 p. 100 de Sulfamide permet une légère multiplication du microbe.

In vivo, les deux sulfamides n'ont montré qu'une faible action anti-infectieuse pour la souris. Chez la poule, le Cibazol s'est montré supérieur à l'Eubasinum.

En Roumanie, T. Otel a expérimenté l'action anti-infectieuse de la « Proseptine » (Diamino-azobenzol-sulfonate-diéthylamine) dans le choléra des poules. Il obtint des résultats en administrant ce médicament à la dose de 0,42 g. quarante-huit heures avant l'infection. Mais cette dose semble être très voisine de la dose toxique qui provoque chez la poule la destruction des globules rouges, ainsi que des troubles généraux graves.

Chez les autres espèces animales, F. C. Krumveld et M. Mansjær réussissent à empêcher une infection expérimentale à *P. bubaliseptica*, en utilisant le Septoplix et la Soluseptasine.

Recherches personnelles.

Des essais préliminaires faits surtout sur le pigeon nous ont permis de choisir, en vue d'une expérimentation plus large, le Sulfamide le plus actif vis-à-vis de l'infection à *Pasteurella avicida*. Comme il résulte d'une de nos expériences ci-dessous résumées, c'est le Sulfathiazol qui jouit de la plus grande activité microbicide vis-à-vis de ce germe.

EXPÉRIENCE. — Nous avons essayé 5 Sulfamides, à savoir : 1° 1 Sulfamide azoïque, le Prontosil ; 2° 1 autre non azoïque, le Septoplix ; 3° la Soluseptasine ; 4° la Sulfapyridine et 5° le Sulfathiazol.

Pour chaque produit on a utilisé 4 pigeons qui furent infectés deux heures après la première administration du Sulfamide. Chaque pigeon reçut par voie intramusculaire, 10 doses minima mortelles de culture virulente de *P. avicida*, c'est-à-dire 10^{-8} de la dilution d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures. Après l'infection, les pigeons ont continué à recevoir du sulfamide toujours par voie parentérale. L'intervalle d'une administration à l'autre n'a jamais dépassé sept heures. Les doses de médicament ont varié d'une administration à l'autre. Ce traitement fut appliqué pendant trois jours.

Voici des résultats obtenus :

Le Prontosil (4' sulfamido 2-4 diaminobenzène = Rubiazol I)

n'a pu sauver aucun pigeon ; tous sont morts respectivement seize, quarante-huit, quarante-huit et soixante-douze heures après l'infection, soit pour ces derniers, avec un certain retard, comparative-ment aux témoins qui sont morts tous les deux vingt-quatre heures après l'infection. Le pigeon qui est mort soixante-douze heures après l'infection avait reçu en tout 350 mg. de Prontosil en solution.

Le Septoplix (= sulfamide = *p.* aminophénylsulfamide) a empêché l'infection chez 2 pigeons ; les 2 autres sont morts neuf et quatorze jours après l'infection. Chaque pigeon a reçu pendant les trois jours de traitement 1,160 g. de substance en suspension dans de l'huile végétale.

La Soluseptasine (*p.* phénylpropylamino-phénylsulfamide disulfonate de sodium) a sauvé aussi 2 pigeons sur 4. Deux pigeons sont morts le troisième et le quatrième jour après l'infection. Chaque pigeon avait reçu 0,435 g. de Soluseptasine.

La Sulfapyridine (= 693 = Dagénan) s'est montrée aussi active que les deux substances précédentes : 2 pigeons ont résisté tandis que 2 succombaient sept et dix-neuf jours après l'infection. La quantité totale de médicament administré fut de 1,160 g. en trois jours.

Le Sulfathiazol a montré la plus grande activité microbicide. A la même dose que la Sulfapyridine il a empêché l'infection chez tous les pigeons.

Les 8 pigeons qui ont définitivement résisté furent inoculés, vingt-deux jours après l'infection, par voie intramusculaire, avec 10 doses minima mortelles de culture virulente qui tue le pigeon normal en vingt-quatre heures. Trois pigeons seulement ont résisté à cette épreuve : un provenant du lot de Sulfapyridine et deux du lot de Sulfathiazol. Donc à la suite d'une infection guérie par un Sulfamide, un certain degré d'immunité s'installe chez le pigeon.

Dans une autre expérience, et toujours chez le pigeon, nous avons réussi, en administrant à chaque animal, pendant trois jours, 1,160 g. soit de Septoplix, soit de Sulfapyridine, à sauver jusqu'à 75 p. 100 des pigeons infectés.

Le Sulfathiazol à la même dose, qui est d'ailleurs trop forte, guérit tous les animaux infectés.

EXPÉRIENCE. — 12 pigeons sont répartis en 4 lots : le premier lot de 3 pigeons reçoit *per os* le sulfamide à la dose de 0,5 g. trois heures avant l'infection ; un deuxième lot la reçoit trois heures après l'infection ; un troisième lot huit heures après l'infection ; les pigeons du quatrième lot servent de témoins. L'infection est faite avec 10 doses minima mortelles.

Les pigeons témoins du quatrième lot succombent respectivement vingt et une, vingt-cinq et vingt-sept heures après l'infection ; de ceux

du troisième lot, 2 succombent vingt-neuf et trente heures après l'infection ; le troisième résiste. Les pigeons du premier et du deuxième lot ont résisté.

Dans une autre série d'expériences, nous avons essayé aussi le Tibatin. Il s'est montré totalement inactif vis-à-vis d'une infection provoquée chez la poule par la *P. avicida*.

En conclusion, ces essais nous ont montré que le Sulfamide qui possède l'activité microbicide la plus remarquable vis-à-vis de *P. avicida* est le Sulfathiazol. La Sulfapyridine, le Septoplix et la Soluseptasine ont une activité moindre. Le Prontosil et le Tibatin sont totalement inactifs.

Nous exposerons ci-après les résultats des autres expériences faites tant *in vitro* que *in vivo* (sur des poules) et qui concernent l'activité du Sulfathiazol sur la *P. avicida*.

CULTURE DE *P. avicida* DANS DU BOUILLON AU SULFATHIAZOL.

EXPÉRIENCE. — On prépare 3 séries de tubes au bouillon. Chaque tube contenait 9 c. c. de bouillon au pH 7,8. La première et la deuxième série contenaient du bouillon au Sulfathiazol, à une concentration variant d'une série à l'autre ; la troisième série de tubes contenait du bouillon normal. Chaque série estensemencée avec *P. avicida*. La quantité de germesensemencés est différente dans chaque série d'un tube à l'autre. Les résultats et les détails de l'expérience sont résumés dans le tableau I.

Le Sulfathiazol à la concentration de 0,055 p. 100 et même de 0,0055 p. 100 inhibe le développement de *P. avicida* à partir d'un certain nombre de germesensemencés. Si on considère que la culture en bouillon dont nous nous sommes servis pour ensemen-
cer le bouillon au Sulfathiazol contenait un milliard de germes (chiffre qui n'est pas très éloigné de la réalité, en tenant compte que la dilution 10^{-10} est restée stérile), le Sulfathiazol, aux concentrations utilisées par nous, empêche la *P. avicida* de se multiplier lorsqu'on ensemence moins de 100.000 germes dans 10 c. c. de bouillon. La substance est inactive si la quantité de germesensemencés est assez grande ; dans les premiers tubes des séries contenant du bouillon au Sulfathiazol, une culture aussi abondante qu'en bouillon normal s'est développée. En faisant des dilutions, quatre jours après l'ensemencement, à partir du tube n° 4 (bouillon au Sulfathiazol), ainsi que du tube n° 16 (bouillon normal), nous avons pu constater que les deux tubes contiennent le même nombre de germes. A partir des dilutions 10^{-8} et 10^{-9} du tube n° 4 ainsi que du tube n° 16, nous avons inoculé un pigeon avec chaque dilution. Les pigeons inoculés à partir des dilutions faites du tube n° 4 sont morts respectivement vingt et quarante-huit heures après l'infection ; de ceux inoculés à partir des mêmes

dilutions faites du tube n° 16, un seul est mort (celui inoculé à la dose de 10^{-8}), l'autre a résisté.

Donc, une fois les facteurs inhibiteurs apportés dans le milieu de culture par le Sulfathiazol, neutralisés, la *P. avicida* pousse en négligeant la présence de cette substance ; la virulence des germes n'est nullement altérée. Mais la forme du microbe semble subir certaines modifications. Les germes qui se sont multipliés en présence d'une forte concentration de sulfamide (0,055 p. 100) ont, en effet, un aspect différent de ceux qui ont poussé dans du bouillon normal. Ils sont plus longs, plus gros et très vacuolisés.

Des essais furent faits afin de voir si dans du bouillon au Sulfathiazol ayant donné une culture positive, il n'y a pas consommation de la substance médicamenteuse. Mais par les moyens que nous avons utilisés, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence quelconque entre la concentration en sulfamides des tubesensemencés ou non. Dans les tubes au Sulfathiazol qui furent faiblementensemencés et qui sont restés stériles, on n'a pas trouvé des germes vivants. Les repiquages faits dans du bouillon ou sur la gélose sont toujours restés stériles.

TABLEAU I.

NUMÉRO DU TUBE	CONCENTRATION du bouillon en sulfathiazol	QUANTITÉ de culture ensemencée	RÉSULTAT de l'ensemencement	
			24 heures après	48 heures après
1	0,055 p. 100	10^{-1}	+	+
2	0,055 p. 100	10^{-2}	+	+
3	0,055 p. 100	10^{-3}	+	+
4	0,055 p. 100	10^{-4}	—	+
5	0,055 p. 100	10^{-5}	—	—
6	0,055 p. 100	10^{-6}	—	—
7	0,0055 p. 100	10^{-1}	+	+
8	0,0055 p. 100	10^{-2}	+	+
9	0,0055 p. 100	10^{-3}	+	+
10	0,0055 p. 100	10^{-4}	+	+
11	0,0055 p. 100	10^{-5}	—	—
12	0,0055 p. 100	10^{-6}	—	—
13	Témoin.	10^{-6}	+	+
14	Témoin.	10^{-7}	+	+
15	Témoin.	10^{-8}	+	+
16	Témoin.	10^{-9}	+	+
17	Témoin.	10^{-10}	—	—

En résumé : *In vitro*, le Sulfathiazol peut inhiber le développement de *P. avicida* si celle-ci n'est pas abondammentensemencée. Si, au contraire, elle est richementensemencée, elle pousse aussi bien dans du bouillon au Sulfathiazol que dans du bouillon normal.

Sa virulence n'est pas altérée. Mais une forte concentration sulfamidique modifie l'aspect morphologique des germes.

LE POUVOIR PROTECTEUR DU SULFATHIAZOL
DANS L'INFECTION EXPÉRIMENTALE A *P. avicida* CHEZ LA POULE.

Chez les poules, nous avons utilisé seulement le Sulfathiazol qui a montré, dans les expériences faites sur le pigeon, une puissance anti-infectieuse remarquable. Au cours de nos essais, nous avons utilisé du Sulfathiazol de préparations différentes : suisse (Cibazol), française (Thiazomide) et allemande (Eleudron). Les résultats obtenus furent sensiblement les mêmes.

Pour l'infection, nous avons employé des souches de *P. avicida* récemment isolées des cadavres de poules mortes de choléra. Les souches de *P. avicida* immédiatement après l'isolement ont montré en général la même virulence. Voici quels furent les résultats du titrage de l'une des souches que nous avons employées dans nos premières expériences.

La souche n° 5723 ne tuait pas la poule à la dose de 10^{-10} d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures. A la même dose elle tuait un pigeon sur deux. A la dose de 10^{-9} elle tuait la poule en trois jours et le pigeon en trente heures. La dose minima mortelle pour la poule était donc un milliardième d'une culture en bouillon.

Le Sulfathiazol s'est montré chez les poules aussi actif que chez le pigeon.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — a) 3 poules sont sulfamidées le 23 octobre à 13 heures. Chaque poule reçoit *per os* 0,5 g. de Sulfathiazol. Quatre heures plus tard 3 sont infectées avec *P. avicida*. On inocule à chaque poule par voie intramusculaire 10 doses minima mortelles. Les poules ont toutes résisté.

b) Trois poules sont sulfamidées dans les mêmes conditions. L'infection est faite à la même dose, mais cette fois tout de suite après l'administration du Sulfamide. Les poules ont résisté.

c) Trois poules sont sulfamidées dans les mêmes conditions que les précédentes. L'infection est faite à la même dose mais quinze heures après l'ingestion du sulfamide.

Résultats : Une poule est morte quarante-huit heures après l'infection. La région pectorale dans laquelle l'inoculation avait été pratiquée est très tuméfiée, les muscles ont l'aspect de la chair bouillie ; ils sont pâles, très friables et entourés d'une masse gélatineuse, presque fluide. Les organes internes ne présentent pas de lésions caractéristiques. Les suffusions sanguines ainsi que les zones nécrotiques du foie sont absentes. Les *Pasteurella* y sont assez rares.

La deuxième poule, bien qu'elle ait présenté le deuxième et le troisième jour des symptômes assez graves de choléra (dyspnée, somnolence) ne meurt que le dixième jour. On trouve à l'autopsie une nécrose

étendue de la peau au lieu de l'inoculation. Les cultures des organes furent positives.

La troisième poule a résisté.

Parallèlement aux trois lots, d'expérience on a inoculé comme témoins 2 poules : une à la dilution de 10^{-9} et l'autre 10^{-8} . Les 2 poules sont mortes respectivement quarante-six et quarante-quatre heures après l'infection.

Le Sulfathiazol peut prévenir et même guérir une infection à *P. avicida*. Sa valeur préventive est limitée au maximum à deux jours, comme il résulte de l'expérience suivante.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Un lot de 4 poules est sulfamidé. Chaque poule reçoit 0,5 g. de Sulfathiazol par voie buccale. 2 de ces poules sont infectées deux jours et les 2 autres quatre jours plus tard. Chaque poule reçoit 10^{-8} d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures, donc 10 doses minima mortelles. Une poule infectée deux jours après l'administration de Sulfamide a résisté ; les 3 autres poules sont toutes mortes de choléra. A l'autopsie elles présentent de grandes lésions œdémateuses locales.

Le Sulfathiazol, administré *per os* simultanément à l'infection, peut protéger la poule vis-à-vis de doses de culture encore plus importantes que celles que nous avons utilisées dans les expériences précédentes.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — a) Deux poules reçoivent chacune 0,5 g. de Sulfathiazol *per os* ; ensuite on inocule à chacune 10^{-4} d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures.

Les poules ont résisté.

b) Deux poules sont sulfamidées et infectées dans les mêmes conditions que celles du lot précédent, mais la dose de culture inoculée est dix fois plus grande : 10^{-3} .

Les poules résistent.

c) Deux poules sont sulfamidées et infectées dans les mêmes conditions que les précédentes, mais la dose de Sulfamide est réduite de moitié — 0,25 g. — tandis que la dose de culture est dix fois plus grande 10^{-2} .

Les poules ont résisté.

d) Deux autres poules sont sulfamidées à une dose encore plus réduite — 0,125 g. —, l'infection est faite à la dose de 10^{-2} .

Les poules sont mortes quarante-huit heures après l'infection.

e) Deux poules sont sulfamidées et infectées aux mêmes doses que celles du lot précédent, mais le Sulfamide — 0,125 g. — est inoculé par voie intramusculaire (la substance médicamenteuse est mise en suspension dans une solution de gomme arabique).

Les poules ont résisté.

f) Deux poules reçoivent, *per os*, 0,5 g. de Sulfathiazol ; aussitôt après elles sont inoculées avec une très forte dose de culture en bouillon de *P. avicida* : 0,1 c. c. pour chaque poule.

Les poules sont mortes respectivement vingt et quarante-huit heures après l'infection. A l'autopsie, intense réaction locale.

g) On administre *per os* du Sulfamide à deux poules — 1 g. chacune. Une heure plus tard elles sont infectées à la dose de 0,1 c. c. d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures.

Les 2 poules sont mortes de choléra respectivement quatre et cinq jours après l'infection.

h) Trois poules sont sulfamidées et infectées avec *P. avicida* dans les mêmes conditions que celles du lot précédent. Mais six heures après l'infection chacune reçoit encore 0,5 g. de Sulfathiazol.

Résultat : deux poules sont mortes : une seule a résisté.

Donc le Sulfathiazol administré *per os* à la dose de 0,5 g. ou même de 0,25 g., ou par voie parentérale à la dose de 0,125 g., protège la poule vis-à-vis d'une infection faite à une dose de culture qui représente pour l'espèce au moins 10 millions de doses minima mortelles (1).

LA TOLÉRANCE DE L'ORGANISME DE LA POULE AU SULFATHIAZOL.

La dose de 0,5 g. de Sulfathiazol administrée par voie buccale fut toujours parfaitement supportée par nos poules. Nous avons, chez une partie de nos animaux, répété plusieurs fois cette dose sans remarquer aucun trouble. Le sang n'est pas sensiblement modifié par cette dose de sulfamide. Le nombre des globules rouges ne diminue pas ; les globules blancs, eux aussi, ne souffrent des modifications ni dans leur nombre, ni dans leur rapport.

Une dose plus forte de Sulfathiazol provoque parfois des troubles assez graves de l'appareil gastro-intestinal.

L'ABSORPTION ET L'ÉLIMINATION DU SULFATHIAZOL CHEZ LES POULES.

Nous avons fait, à ce sujet, plusieurs expériences ; les résultats obtenus ne sont pas toujours concordants. Nous donnons ci-dessous les résultats d'une seule expérience.

Quatre poules sont sulfamidées par voie buccale ; chaque poule reçoit 1 g. de substance. Une heure plus tard, trois poules sont infectées avec une forte dose, 0,1 c. c. d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures. Une, trois, six et vingt-quatre heures après l'administration du

(1) A la fin de l'hiver et au cours du printemps, les poules sont plus sensibles à la *P. avicida* que pendant les autres saisons. Pendant ces saisons, il nous est arrivé que les mêmes doses de Sulfamide ne réussissent pas à enrayer une infection faite avec une forte dose de culture. En toute saison d'ailleurs, il faut utiliser des poules dont l'état général est parfait. Les poules utilisées par nous étaient toujours de la race commune en Roumanie.

TABLEAU II. — Absorption et élimination du Sulfathiazol chez les poules normales ou infectées au *Pasteurella avicida*.

POULE	DOSAGE DU SULFAMIDE DANS LE SANG en milligrammes				Résultat
	après 1 heure	après 3 heures	après 6 heures	après 24 heures	
G. A. infectée .	4,8 (1)	1,5	0		Morte 22 heures après l'infection.
G. R. infectée .	10,0	8,0	5,6	0,2	Morte 48 heures après l'infection.
C. infectée . .	6,0	2,8	1,8	0	Résiste.
G. N. témoin .	6,4	6,4	6,0	0,5	

(1) La quantité du sulfamide est calculée pour 100 c.c. de sang.

Sulfathiazol les quatre poules sont saignées pour faire le dosage du médicament dans leur sang.

Les résultats sont notés dans le tableau ci-dessus. Il ressort de ces chiffres que le sulfamide s'absorbe assez vite. Une heure après l'administration, la concentration du médicament atteint dans le sang le chiffre maxima. Chez la poule non infectée, cette concentration se maintient au moins pendant six heures, tandis que chez les poules infectées, on constate régulièrement une diminution rapide de la quantité de sulfamide circulante. Cette baisse peut s'expliquer par une consommation de sulfamides par les organismes infectés.

On constate aussi, en examinant les chiffres du tableau, que la quantité de sulfamide absorbée peut varier du simple au double d'une poule à l'autre. Ces différences individuelles dans le pouvoir adsorbant n'est pas sans répercussion sur l'évolution de la maladie. C'est ainsi que la poule G. A. qui absorbe mal le sulfamide succombe au choléra très vite, tandis que les deux autres poules qui ont mieux adsorbé le médicament, ont mieux résisté à l'infection.

Ces constatations peuvent expliquer certains succès, ou mieux encore certaines variations dans les résultats donnés par la sulfamidothérapie.

PAR COMPARAISON AVEC LE SULFATHIAZOL, QUELLE EST LA VALEUR PRÉVENTIVE DE L'IMMUNOSÉRUM ?

EXPÉRIENCE. — a) Deux poules reçoivent par voie intramusculaire 5 c.c. d'un immunosérum.

b) Deux autres poules reçoivent de même la moitié de cette dose, 2,5 c. c.

c) Et enfin, deux autres poules qui constituent le troisième lot sont injectées de la même façon, mais à la dose de 1 c.c.

Vingt-quatre heures plus tard, les poules des trois lots sont infectées avec *P. avicida* ; chaque poule reçoit par voie intramusculaire 0,01 c. c. d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures.

Résultat : les poules du premier et du deuxième lot ont survécu à cette sévère épreuve ; celles du troisième lot sont mortes respectivement deux et trois jours après l'infection.

Dans une autre expérience, nous avons pu constater que le sérum à la dose de 4 c. c. peut protéger la poule vis-à-vis d'une forte dose de culture — 0,1 c. c. Les sulfamides n'ont sauvé que rarement les poules infectées avec une telle dose. Le sérum immun s'élimine de l'organisme beaucoup plus lentement que le sulfamide ; la durée de l'immunité qu'il confère est donc plus longue.

EXPÉRIENCE. — Quatre poules sont séruminées le 19 octobre. Chaque poule reçoit 2,5 c. c. d'immunsérum.

Deux de ces poules sont infectées avec *P. avicida* quatre jours plus tard ; chaque poule reçoit 0,0001 c. c. d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures. Les poules ont résisté.

Les deux autres poules sont infectées avec la même dose de culture quatre jours plus tard.

Une poule est morte de choléra deux jours après l'infection. L'autre a résisté.

L'immunité conférée par le sérum immun dure en moyenne huit jours.

Le sérum se montre donc supérieur aux sulfamides tant par son innocuité parfaite que par sa valeur préventive.

L'IMMUNITÉ CONTRE LE CHOLÉRA DES POULES.

Nos expériences ont démontré qu'il est possible de conférer aux poules une immunité si solide qu'elles peuvent résister à un milliard de doses minima mortelles. On arrive à ces résultats en inoculant aux poules des doses croissantes de cultures simultanément aux sulfamides ou au sérum immun. Voici à titre d'exemple le protocole de quelques-unes de nos expériences.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Six poules sont infectées avec *P. avicida* à la dose de 10^{-8} d'une culture en bouillon ; on administre simultanément à chaque poule 0,5 g. de Sulfamide *per os*.

Le 4 novembre — douze jours-plus tard — les six poules subissent le même traitement, mais la dose de culture est portée à 10^{-6} d'une culture en bouillon.

Le 14 novembre, on augmente de nouveau la dose de culture — 0,01 c. c., la dose de Sulfathiazol restant la même. Trois poules n'ont

pas supporté cette dose et elles sont mortes respectivement deux, deux et cinq jours plus tard de choléra. La quatrième poule a maigri énormément ; sa mort ne survint que le 28 janvier.

Le 2 décembre, on répète le traitement du 14 novembre sur les deux survivantes. Une seule poule reste ; l'autre meurt de choléra.

La poule qui a résisté est inoculée avec *P. avicida* à la dose de 0,01 c. c. les 19 décembre, 12 et 28 janvier et le 17 février. Chaque infection est accompagnée d'administration par voie buccale d'une pastille de Sulfathiazol, c'est-à-dire 0,5 g.

Les 2, 17 et 31 mars, 14 avril, 7 et 14 mai, la poule est inoculée, toujours parallèlement à l'administration de 0,5 g. de Sulfamide *per os*, respectivement aux doses de 0,04 ; 0,08 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1 c. c. de culture en bouillon d'une souche virulente de *P. avicida*.

Le 27 mai, on éprouve l'immunité en lui inoculant, cette fois sans Sulfamide, 0,2 c. c. de culture. La poule résiste. Des doses progressives de cultures virulentes sont inoculées à cette poule le 19 juin (0,5 c. c.), le 14 juillet (0,5 c. c.), le 26 juillet (1 c. c.), le 9 août (1,25 c. c.). Après une pause de 42 jours, la poule est infectée à la dose de 0,5 c. c. Elle meurt de choléra deux jours plus tard. La poule était maigre, anémiée par un séjour en cage de presque un an.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Deux poules et un coq sont infectés et sulfamidés le 12 décembre. Chaque poule reçoit par voie intramusculaire 0,01 c. c. de culture en bouillon de *P. avicida* et par voie buccale 0,5 g. de Sulfathiazol. Les poules résistant, on leur applique le même traitement le 12 janvier. Une poule, n° 12, et le coq, n° 23, résistent ; l'autre poule maigrit et meurt cachectique le 2 février.

A la poule et au coq, on inocule la même dose de culture virulente et on leur administre la même quantité de Sulfathiazol le 28 janvier et le 17 février. Le 2 mars on augmente la dose de culture à 0,02 c. c., la quantité de Sulfamide restant la même.

Toujours simultanément à l'administration de 0,5 g. de Sulfathiazol, on inocule aux deux oiseaux le 17 mars, 0,04 c. c. de culture ; le 31 mars, 0,1 c. c. ; le 14 avril, 0,2 c. c. ; le 7 mai, 0,5 c. c. et le 14 mai, 1 c. c. Le 27 mai, on éprouve leur immunité en leur inoculant de la culture virulente à la dose de 0,2 c. c. Ils résistent. On continue de leur inoculer de la culture. C'est ainsi qu'ils reçoivent le 7 juin : 0,5 c. c. ; le 19 juin, 0,5 c. c. ; le 2 juillet, 0,5 c. c. ; le 14 juillet, 0,5 c. c. ; le 26 juillet, 1 c. c. ; le 9 août, 1,25 c. c. ; le 21 septembre, 0,5 c. c. ; le 13 octobre, 0,5 c. c.

Par des méthodes similaires et en employant l'immunsérum on a également réussi à immuniser des poules. Mais les pertes au cours de l'immunisation sont aussi sévères que lors de l'utilisation du sulfamide. C'est ainsi que d'un lot de quatre poules, une seulement est arrivée à supporter un milliard de doses minimales mortelles d'une culture de *P. avicida*.

Au total, on a essayé d'immuniser 26 poules dont 5 sont arrivées à supporter de fortes doses de culture virulente et trois seulement ont définitivement résisté. Deux poules, bien qu'elles aient fait preuve d'une assez solide résistance, sont mortes à la suite d'une inoculation de culture qui, une fois, ne dépassait pas les

doses précédemment administrées. C'est ainsi qu'est survenue la mort d'une poule de la première expérience. La deuxième poule fait partie d'un lot sur lequel on a essayé une immunisation rapide. On a administré d'emblée de fortes doses de cultures — 0,1 c. c., ainsi que des quantités très grandes de Sulfathiazol (jusqu'à 2 gr. en vingt-quatre heures). On a répété quatre fois ce traitement ; ensuite on a inoculé de la culture seule. Les deux premières inoculations étaient faites à la dose de 0,2 c. c. et elles furent très bien tolérées ; la troisième fut faite à une dose plus forte de culture : 0,5 c.c. La poule a succombé deux jours plus tard. A l'autopsie, on a constaté que la lésion principale était située dans les poumons, ceux-ci étaient enflammés et entourés d'une masse gélatineuse riche en liquide clair. Les pasteurelles y abondent, alors que dans les autres organes, elles étaient assez rares. L'état général de la poule était très bon.

On ne saurait expliquer d'une manière satisfaisante le mécanisme de la résistance de nos poules. Il est certain que l'inoculation par voie sous-cutanée de culture virulente est suivie chez les poules immunes ou sulfamidées, de la formation d'un foyer inflammatoire. Ce foyer se développe assez vite — quelques heures — et il contient un liquide clair, citrin. La *Pasteurella* disparaît d'ordinaire au bout de vingt-quatre heures. Mais chez une poule sulfamidée nous avons trouvé des germes, par culture, dans ce foyer, même après huit jours. Ceux-ci par ce séjour en contact avec les humeurs et le sulfamide, n'avaient rien perdu de leur pathogénité ; ils tuaient le pigeon à la même dose que ceux de la souche d'origine.

Chez les poules immunes, l'infection à une forte dose de culture virulente provoque une réaction thermique ; celle-ci ne dépasse jamais un degré. L'ascension de la courbe thermique dure d'habitude deux jours.

Le fait que les poules à la suite des infections répétées prévenues par des sulfamides deviennent immunes, prouve que le médicament n'agit pas *in vivo* comme un antiseptique et que l'organisme prend une part active dans la destruction des germes. Le sérum immun, lui aussi, agit à l'égard du germe par l'intermédiaire de l'organisme.

Conclusions.

Les expériences préliminaires faites sur le pigeon ont démontré que le Sulfathiazol a une action spécifique vis-à-vis des infections provoquées par la *P. avicida*. La Soluseptasine, le Septoplix et la Sulfapyridine sauvent au maximum 75 p. 100 des pigeons infectés. Le Prontosil ainsi que le Tibatin se sont montrés totalement inactifs.

Le Sulfathiazol *in vitro* se montre bactéricide, à condition que

les germes ensemencés ne soient pas trop nombreux. Si ce nombre dépasse 10.000 pour 10 c. c. du bouillon au Sulfathiazol à la concentration de 0,055 ou 0,0055 p. 100, alors la *P. avicida* se multiplie et le nombre des germes est finalement le même que dans les tubes témoins. Les microbes qui ont végété en présence de Sulfathiazol ne sont pas du tout modifiés dans leur pouvoir pathogène.

In vivo, chez les poules, le Sulfathiazol montre une haute valeur anti-infectieuse. Administré *per os* à la dose de 0,25 g. simultanément à l'inoculation de la culture, il empêche une infection faite avec une forte dose de culture virulente — 0,01 c. c. — ce qui représente au moins 10 millions de doses minima mortelles.

Le Sulfathiazol à la dose de 0,5 g. est parfaitement toléré par la poule. La dose de 1 g., administrée d'un coup, peut provoquer des accidents qui se traduisent par la parésie du jabot et la non absorption du médicament.

Le sulfamide s'éliminant très vite de l'organisme de la poule, il résulte que la résistance qu'elle peut conférer est de très courte durée — au maximum deux jours.

Le sérum immun à la dose de 2,5 c. c. protège la poule vis-à-vis d'une infection à *P. avicida* faite avec 10 millions de doses minima mortelles. A la dose de 4 c. c., il protège la poule vis-à-vis d'une infection dix fois plus grande. La durée de l'immunité conférée par le sérum est au maximum de huit jours.

Les infections à *P. avicida* prévenues par les sulfamides ou par le sérum immun confèrent à la poule ainsi qu'au pigeon un certain degré d'immunité. A la longue, les poules traitées plusieurs fois de cette manière acquièrent une immunité assez solide ; elles peuvent supporter sans aucun traitement plus d'un milliard de doses minima mortelles de culture virulente.

Mais au cours de l'immunisation un grand nombre de poules meurent de choléra, ou elles deviennent cachectiques et succombent sans présenter des lésions de pasteurellose. D'autre part, les poules qu'on croyait immunes peuvent succomber à une nouvelle infection. L'immunité que les poules peuvent donc acquérir se montre assez fragile. Cette fragilité n'est pas due au germe mais à la poule, à l'impossibilité de son organisme de fabriquer des anticorps. En effet, par rapport au sérum immun de cheval, les sérums de poules immunisées sont de beaucoup plus pauvres tant en anticorps agglutinants que protecteurs.

La prophylaxie du choléra des poules, étant donné l'incapacité de cette espèce à acquérir une immunité active, doit se faire par des sérums ou par des sulfamides. Ces derniers pourraient offrir quelques avantages par rapport au sérum immun.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUTSCHEEF (N.). — *Arch. f. Tierh.*, 1942, **78**, 195.
CORDOSO (P. M.), REIS (J.) et NOBREGA (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 309.
CERNALANU (C.). — *Zeitschr. Infektionskr. Haustiere*, 1942, **58**, 142.
KRANEVELD (F. C.) et MANSJER (M.). — *Nederl. Ind. Blad. Diergeneesk.*, 1940, **52**, 29.
LEVADITI (C.) et REINIÉ (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1179.
LEVADITI (C.) et VAISMAN. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 283.
OTEL (T.). — *Thèse n° 841. Fac. Méd. Vétérinaire, Bucarest.*

SUR LA PROTÉINE DE LA GRASSERIE DU VER A SOIE

III. — ÉTUDE DE CERTAINS DE SES GROUPEMENTS LIBRES (*)

par PIERRE DESNUELLE et CHANG CHI TAN.

(Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences.
Institut de Chimie de l'Université, Lyon.)

Deux précédentes études [1, 2] nous ont permis de caractériser et de doser un certain nombre des acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse de la protéine du virus de la grasserie. Mais, il convient de remarquer que, d'une façon générale, préalablement à toute hydrolyse, les molécules protéiques intactes possèdent certains groupements libres dont l'étude semble être parfois de toute première importance. Tel est le cas en particulier des protéines physiologiquement actives dont les propriétés paraissent être liées à la présence, dans leurs molécules, de groupements libres à caractère chimique bien déterminé. On a donc cherché depuis quelques années à réaliser le blocage sélectif de tel ou tel groupement libre de ces protéines afin d'en étudier les conséquences sur leur activité, et il semble que ce soit l'acétylation par le cétène qui ait donné à cet égard les résultats les plus intéressants.

Quand on traite en effet par le cétène soit la pepsine (Herriott et Northrop [3], Herriott [4]), soit l'hormone pituitaire (Li et coll. [5]) et l'insuline (Stern et White [6]), soit le virus de la mosaïque du tabac (Stanley [7], Miller et Stanley [8], Schramm et Müller [9, 10]) on peut constater de façon tout à fait générale que l'acétylation complète des groupements aminés libres de ces diverses protéines n'affecte en rien leurs propriétés physiologiques, tandis que l'acétylation commençante de leurs OH-phénoliques entraîne une rapide inactivation.

Il nous a paru intéressant de répéter de telles expériences avec le virus de la grasserie. Mais avant d'étudier sur le ver à soie l'activité de la protéine en fonction de son acétylation, il était nécessaire de déterminer, sur le plan chimique, comment s'effectue cette acétylation. La première partie du présent travail est

(*) Note présentée à la séance du 2 mars 1944 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

ainsi consacrée à l'étude de l'action du cétène sur la protéine du virus.

D'autre part, Felix et ses collaborateurs [11, 12] ont indiqué qu'il était possible, en faisant passer un courant d'acide chlorhydrique à sec à travers une suspension fine de protéine dans le méthanol rigoureusement anhydre, d'obtenir, sans hydrolyse notable, le chlorhydrate de son ester méthylique. L'augmentation de la teneur de la protéine en halogène et en groupes méthoxyles doit permettre alors de déterminer, dans la molécule protéique, le nombre d'une part des groupements basiques libres susceptibles d'être salifiés par un acide fort, et d'autre part des carboxyles libres estérifiables.

Signalons cependant que Kiesel et Znamenskaja [13] ont nié que l'on pouvait, dans ces conditions expérimentales, estérifier une protéine sans la dégrader plus ou moins profondément. Il nous semble, d'autre part, que l'exactitude des résultats expérimentaux publiés par Felix soit sujette à caution. Toute cette question, susceptible de nous renseigner utilement sur la structure des molécules protéiques, paraît donc devoir être étudiée de nouveau de façon systématique.

Quoi qu'il en soit, et sans vouloir entreprendre ici une discussion générale du sujet, nous avons consacré la deuxième partie du présent travail à l'étude du comportement vis-à-vis de l'estérification, de la protéine du virus de la grasserie ; à la préparation, d'un ester soluble dans l'eau dont l'activité physiologique pourra être essayée ultérieurement ; enfin, à la comparaison des propriétés de cet ester avec ce que nous savons déjà de la constitution de la protéine.

I. — ACÉTYLATION DE LA PROTÉINE DU VIRUS PAR LE CÉTÈNE.

Le cétène utilisé est produit dans un appareil analogue à celui décrit par Herriott [14] par pyrolyse de l'acétone en vapeur au contact d'un fil de tungstène de 0,15 mm. de diamètre et 50 cm. de long, parcouru par un courant de 3,6 amp. Le gaz barbote après purification dans 10 c. c. de tampon acétate à pH 5,5 contenant en suspension 120 mg. de protéine fraîchement précipitée.

Après des temps d'acétylation variables, la protéine est recueillie par centrifugation et lavée. On suit alors dans les divers échantillons quelques-unes des transformations d'ordre chimique intervenues.

1° DOSAGE DE L'AZOTE DES GROUPEMENTS AMINÉS LIBRES. — La protéine plus ou moins acétylée est dissoute dans une solution de soude N/30 et un volume connu de cette solution, après neutralisation éventuelle, est soumis au dosage selon Van Slyke (temps

d'action trente minutes). Voici, à titre d'exemple, les résultats numériques obtenus avec la protéine du virus avant acétylation :

47,6 mg. de virus (en solution dans NaOH N/30) dégagent, compte tenu d'un essai témoin, 0,63 c. c. de N_2 (Temp. : 15°, pression : 752 mm. Hg), soit N de NH_2 libre = 0,765 p. 100.

2° ETUDE DE LA DISPARITION DES GROUPEMENTS HYDROXYLES PHÉNOLIQUES AU COURS DE L'ACÉTYLATION. — On sait que la coloration bleue qui se développe quand on mélange le réactif des phénols de Foline et une protéine en solution légèrement alcaline est due à la tyrosine, au tryptophane et à la cystéine que contient cette protéine. La protéine du virus étant dépourvue de cystéine, la coloration obtenue dans ce cas est proportionnelle à la somme (tyrosine + tryptophane) et il est alors possible d'exprimer cette somme par le poids de tyrosine donnant naissance dans les mêmes conditions à une coloration d'égale intensité. L'application de cette méthode à la protéine du virus est faite de la façon suivante :

29,8 mg. de protéine sont dissous dans 10 c. c. de NaOH N/30. Le pH est amené à 8,0 par addition progressive d'acide acétique N/20. On ajoute alors les quantités habituelles de tampon phosphate M/10 et de réactif des phénols, et on porte la solution claire à 35° pendant quinze minutes :

Somme (tyrosine + tryptophane) trouvée (exprimée en tyrosine) : 5,5 p. 100.

Cette méthode permet d'autre part, d'après Herriott [14] de suivre quantitativement la disparition des OH phénoliques de la protéine au cours de son acétylation. Si on effectue en effet sur une protéine longuement acétylée le dosage colorimétrique précédent dans des conditions de pH telles ($pH = 8$) qu'aucune saponification ne puisse intervenir, la coloration obtenue est plus faible, toutes choses égales d'ailleurs, qu'avec la protéine initiale. Mais si, avant dosage, on maintient quelques instants à $pH = 11,0$ la protéine acétylée, la coloration reprend sa valeur initiale. Remarquant alors, d'une part que la O-acétyl-tyrosine est aisément hydrolysée à $pH = 11$, et d'autre part que le dérivé acétylé du tryptophane est tout à fait stable dans ces conditions, on peut admettre que la baisse du pouvoir chromogène de la protéine que l'on constate après action du cétène, est due à l'acétylation de ses OH phénoliques libres.

Nous avons observé précédemment [4] que si la protéine du virus n'est pas encore précipitée de ses solutions alcalines quand on les amène progressivement à $pH = 8$, elle est, une fois précipitée, presque complètement insoluble dans des tampons ajustés à ces pH ou, tout au moins, ne s'y dissout que très lentement. Il en est de même de ses dérivés acétylés. Si on veut appliquer la méthode d'Herriott à l'étude de cette protéine, on est ainsi obligé

d'opérer en milieu hétérogène, et la coloration produite par la protéine non dissoute ne peut se développer que très lentement. Pour éliminer les causes d'erreur susceptibles de surgir de ce fait, nous avons dû opérer de la façon suivante :

On agite de la même façon, dans des cellules plongées dans un thermostat à 35° et contenant un même volume du mélange tampon + réactif des phénols, d'une part un certain poids de protéine normale, d'autre part un même poids de protéine acétylée. Après des temps bien déterminés, on mesure au stufophotomètre de Pulfrich l'intensité des diverses colorations obtenues. Ces dosages permettent de déterminer, dans chaque cas, l'influence de la non-solubilité de la protéine non acétylée sur son pouvoir chromogène, et de corriger ainsi les valeurs trouvées pour la protéine acétylée. Le tableau I donne quelques-uns des chiffres obtenus avec des échantillons de protéine du virus soumis à l'action du cétène pendant des temps de une demi-heure et de une heure.

TABLEAU I. — Détermination de la somme (tyrosine + tryptophane) dans la protéine du virus acétylées.

TEMPS d'agitation (minutes)	SOMME (TYROSINE + TRYPTOPHANE) POUR CENT						
	Protéine non acétylée			Protéine acétylée			
	En solution	En suspension	Rapport	1/2 heure		1 heure	
				Observé	Corrigé	Observé	Corrigé
15	5,5	3,4	1,6	3,4	5,5	2,5	4,0
30		4,1	1,3	4,0	5,4	3,0	3,9
60		4,6	1,2			3,3	4,0
90		5,1	1,1			3,7	4,1
			Moyenne		5,5		4,0

Ces chiffres montrent que le pouvoir chromogène de la protéine acétylée pendant une demi-heure et une heure est, après correction, tout à fait indépendant du temps d'agitation et représente, selon toute vraisemblance, sa vraie valeur telle qu'elle serait déterminée dans les conditions normales du dosage.

Nous avons réuni dans le tableau II les diverses transformations d'ordre chimique intervenant dans la protéine au cours de son acétylation, telles qu'elles sont décelées par les méthodes de dosages précédentes.

Ces résultats permettent les remarques suivantes :

1° L'azote aminé, libre du virus non acétylé (0,765 p. 100) représente, comme il est d'ailleurs normal de le prévoir, à peu près la

TABLEAU II. — Action du cétène sur la protéine du virus.

TEMPS D'ACÉTYLATION (minutes)	N DES NH ₂ LIBRES (p. 100)	SOMME (tyrosine + tryptophane) calculée en tyrosine (p. 100)
0	0,763	5,5
10	0,289	
20	0,107	
30	0,000	5,4
60	0,000	4,0

moitié de l'azote apporté à la protéine par la lysine [0,880 p. 100] (1).

2° La coloration développée par la protéine du virus au contact du réactif de Folin et due à la tyrosine et au tryptophane engagée dans cette protéine est au contraire bien inférieure à celle que développeraient ces deux amino-acides s'ils étaient libres. Le dosage colorimétrique de la protéine permet en effet de calculer une teneur en (tyrosine + tryptophane) égale à 5,5 p. 100, tandis que l'hydrolysats protéique contient comme on le sait [1] 9,6 p. 100 de tyrosine et 3,3 p. 100 de tryptophane. Ce fait, qui n'est d'ailleurs pas particulier à la protéine du virus, montre que les deux acides (ou tout au moins l'un d'eux) sont, dans l'édifice protéique, partiellement soustraits à l'action du réactif. La cause de cet empêchement nous est d'ailleurs encore inconnue.

3° Comme il a déjà été noté pour d'autres protéines, le cétène, agissant sur la protéine du virus, acétyle d'abord ses groupements aminés libres ; au bout d'une demi-heure, ceux-ci sont en effet complètement bloqués. Ce n'est toutefois qu'au bout d'une heure d'acétylation que l'on peut assister à une baisse nette du pouvoir chromogène de la protéine vis-à-vis du réactif des phénols. Comme ce pouvoir chromogène revient cependant à sa valeur normale si la protéine acétylée est, avant dosage, maintenue quelques instants à pH = 11, la baisse constatée doit être imputée à l'acétylation commençante de ses groupements hydroxy-les phénoliques libres. Il est donc aisé de dissocier dans le temps l'action du cétène sur les groupements aminés et phénoliques de la protéine du virus et de préparer par acétylation d'une demi-heure une protéine qui, si elle ne possède plus aucun groupement aminé libre, a conservé intacts tous ses groupements hydroxy-les phénoliques.

(1) Chiffre calculé à partir de la teneur en lysine correspondant à l'hydrolyse II, considérée comme la plus exacte, du travail de Desnuelle, Chang et Fromageot [4].

II. — ESTÉRIFICATION DE LA PROTÉINE DU VIRUS.

L'estérification est conduite de la manière suivante : 200 mg. de protéine sont mis en suspension dans 6 c. c. d'alcool méthylique fraîchement distillé sur sodium et refroidi à 0°. On fait alors barboter dans cette suspension de l'acide chlorhydrique sec ; après quinze minutes, la protéine passe en solution. On continue alors le barbotage jusqu'à saturation, après quoi la cellule est fermée et abandonnée dans la glace deux heures afin de laisser à la réaction le temps de se terminer. On précipite ensuite par de l'éther anhydre, lave cinq fois le précipité à l'éther et le sèche sous vide, sur potasse et P_2O_5 . On fait enfin deux parts du produit ainsi séché : l'une est séchée de nouveau à 110° sous vide et sur potasse pendant vingt-quatre heures en vue du dosage ultérieur de l'halogène, l'autre est extraite quarante-huit heures à l'éther de pétrole et séchée sur paraffine en vue du dosage des groupements méthoxyles.

On répète ensuite ces diverses opérations jusqu'à ce que l'on obtienne un produit de composition rigoureusement constante. L'estérification de la protéine du virus donne naissance, dans ces conditions, à une poudre extrêmement divisée et un peu jaunâtre, très soluble dans l'eau. Cette solubilité dans l'eau, commune d'ailleurs à tous les chlorhydrates d'esters protéiques, contraste ici de façon frappante avec l'insolubilité presque totale de la protéine initiale.

Les halogènes sont dosés par la méthode de Volhard après traitement de l'ester protéique par l'acide sulfurique en présence de chromate d'argent et de potassium, d'après Zacherl et Krainic [15].

La somme des groupements $O-CH_3$ provenant de l'estérification, et $S-CH_3$ apportés par la méthionine est déterminée par la méthode classique, améliorée récemment par Kuhn et coll. [16].

Dans ce qui suit, la part de cette somme qui revient à la méthionine est calculée en méthoxyle, compte tenu de l'augmentation du poids moléculaire de la protéine après estérification.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Les résultats expérimentaux obtenus comparativement avec de la caséine « d'après Hammarsten » et la protéine du virus sont réunis dans le tableau III.

Il est facile de calculer à partir de ces chiffres le nombre de groupements basiques salifiables et de groupements acides estérifiables présents dans la molécule protéique initiale (tableau IV).

On peut supposer que les groupements basiques salifiables sont

TABLEAU III. — Augmentation de la teneur en halogène et méthoxyle de la caséine et de la protéine du virus après estérification.

PROTÉINE	TENEUR EN HALOGENE pour cent calculée en Cl			TENEUR EN METHOXYLE pour cent		
	Avant esté- rification	Après esté- rification	Diffé- rence	Avant esté- rification	Après esté- rification	Diffé- rence
Caséine	0,02	3,66	3,66	0,62	2,19	1,57
Protéine du virus	0,02	4,04	4,04	0,63	3,98	3,35

TABLEAU IV. — Groupements salifiables et estérifiables de la caséine et de la protéine du virus.

PROTÉINE	POIDS (grammes)	GROUPEMENTS LIBRES	
		salifiables	estérifiables
Caséine	100 000	109	50
Protéine du virus	97 600 (poids mol. min.)	120	111

apportés à la protéine par ses bases hexoniques. Le tableau V rappelle à cet égard ce que l'on sait de la teneur en ces bases des deux protéines considérées :

TABLEAU V. — Teneur de la caséine et de la protéine du virus en bases hexoniques.

PROTÉINE	POIDS (grammes)	NOMBRE DE MOLÉCULES			NOMBRE total de groupes basiques
		d'arginine	d'histidine	de lysine	
Caséine	100 000	21	17	63	101
Protéine du virus	97 600 (poids mol. min.)	31	15	70	116

L'accord entre le nombre de groupements salifiables déduit de la teneur en chlore du chlorhydrate de l'ester et le nombre de groupements basiques mesuré dans un même poids de protéine apparaît donc excellent chez les deux protéines considérées ; il

paraît donc tout à fait improbable qu'une hydrolyse appréciable de ces protéines se soit produite en cours d'estérification.

On pourrait alors être tenté de conclure que le nombre de groupements méthoxyles acquis par les protéines au cours de leur estérification correspond, de la même façon, au nombre de groupements carboxyles libres qu'elles contiennent. La molécule de virus, qui possède 111 groupements estérifiables et 67 groupements amides, devrait ainsi contenir 178 molécules d'acides monoaminés dicarboxyliques.

Si l'on essaie cependant d'effectuer ce calcul pour la caséine « d'après Hammarsten » dont la teneur en les acides aspartique, glutamique et oxyglutamique est bien connue, on obtient les résultats suivants : 100.000 g. de caséine « d'après Hammarsten » contiennent :

Mol. Acide glutamique.	148
Mol. Acide aspartique	30
Mol. Acide oxyglutamique	64
Total.	242
A déduire : groupements amides	125
Groupements carboxyles libres calculés	117
Groupements estérifiables trouvés	50

La différence entre le nombre de groupements estérifiables et le nombre de groupements carboxyles libres apparaît ainsi, dans le cas de la caséine, fort importante et dépasse considérablement les erreurs de dosage susceptibles d'être commises. Les théories actuelles concernant la constitution chimique des protéines ne permettent pas d'en apporter une explication satisfaisante. Une telle différence rend illusoire tout calcul de la quantité d'acides aminés dicarboxyliques contenus dans la protéine du virus à partir de la teneur en groupements méthoxyles du chlorhydrate de son ester méthylique.

RÉSUMÉ.

Le cétène agissant sur une suspension de la protéine du virus de la grasserie dans un tampon à pH = 5,5 acétyle tous ses groupements aminés libres en une demi-heure. Au contraire, ses groupements phénoliques ne commencent à s'acétyle qu'au bout d'une heure. Il est donc possible de préparer, par acétylation d'une demi-heure, une protéine ne possédant plus de NH_2 libres mais dont tous les OH phénoliques sont encore intacts. Il sera intéressant d'en étudier l'activité physiologique.

D'autre part, en faisant passer un courant d'acide chlorhydrique, sec dans une suspension de protéine du virus dans le méthanol anhydre, on peut obtenir le chlorhydrate de son ester méthylique. La teneur en chlore de cette substance permet de calculer, avec une bonne approximation, le nombre de groupements basi-

ques libres apportés à la protéine par l'arginine, l'histidine et la lysine. Une étude comparative faite sur la caséine « d'après Hammarsten » montre qu'il n'existe au contraire aucune relation entre la teneur d'une protéine en groupements carboxyles libres et en groupements estérifiables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DESNUELLE (P.), CHANG (C. T.) et FROMAGEOT (Cl.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 75.
- [2] DESNUELLE (P.) et CHANG (C. T.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 248.
- [3] HERRIOTT (R. M.) et NORTROP (J. H.). *J. Gen. Physiol.*, 1935, **18**, 35.
- [4] HERRIOTT (R. M.). *J. Gen. Physiol.*, 1936, **19**, 283.
- [5] LI (C. H.), SIMPSON (M. E.) et EVANS (H. M.). *Science*, 1939, **90**, 140.
- [6] STERN (K. G.) et WHITE (A.). *J. biol. Chem.*, 1938, **122**, 371.
- [7] STANLEY (W. M.). *Science*, 1936, **83**, 626.
- [8] MILLER et STANLEY (W. M.). *Science*, 1941, **93**, 428.
- [9] SCHRAMM (G.) et MULLER (H.). *Z. physiol. Chem.*, 1940, **266**, 43.
- [10] SCHRAMM (G.) et MULLER (H.). *Z. physiol. Chem.*, 1942, **274**, 267.
- [11] FELIX (K.) et RAUCH (H.). *Z. physiol. Chem.*, 1931, **200**, 27.
- [12] FELIX (K.) et REINDT (H.). *Z. physiol. Chem.*, 1931, **205**, 11.
- [13] KIESEL (A.) et ZNAMENSKAJA (M.). *Z. physiol. Chem.*, 1931, **213**, 89.
- [14] HERRIOTT (R. M.). *J. Gen. Physiol.*, 1935, **18**, 69.
- [15] ZACHERL (M. K.) et KRAINIC (H. G.). *Mikrochemie*, 1932, **11**, 61.
- [16] KUHN (R.), BIRKOFER (L.) et QUACKENBUSCH (F. W.). *Ber. deutsch. chem. Gesell.*, 1939, **70**, 1907.

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA FIXATION DU COMPLÉMENT

par J. CHOUTEAU.

(Institut A. Fournier. Service du Prof. C. LEVADITI.)

INTRODUCTION

Le mécanisme de la fixation du complément dans la réaction de Bordet-Wassermann pour le sérodiagnostic de la syphilis a donné lieu à de nombreux travaux, d'où se sont dégagées deux théories principales : celle de l'ambocepteur et du groupement complémentophile d'Ehrlich et Morgenroth [1] et celle de Bordet [2]. S'appuyant sur les constatations de Dean [3] et Renaux [4], concernant l'état physique et particulièrement la dispersion du complexe antigène-réagine syphilitique et son rapport avec l'intensité de la fixation de l'alexine, Bordet envisage cette fixation comme un phénomène d'adsorption comparable aux phénomènes de teinture. Signalons, par ailleurs, une autre conception, moins importante, suivant laquelle le complément jouerait un rôle de colloïde protecteur vis-à-vis de la floculation antigène-réagine syphilitique et s'épuiserait dans cette action dispersante [5].

Nous avons pensé qu'il était possible d'obtenir quelques précisions sur le mécanisme de la réaction de fixation du complément, en étudiant les vitesses de réaction et, surtout, l'influence de la température sur ces mêmes vitesses.

L'étude des vitesses de réactions sérologiques n'est guère sortie du domaine de l'empirisme. Bordet (*loc. cit.*) admet que la réaction nécessite un certain temps de fixation, qui paraît varier suivant les techniques des divers auteurs, entre trente minutes et une heure. Nos premiers travaux, avec H. Rocher, nous ont montré que la réaction de Bordet-Wassermann était de nature réversible [6] et progressive [7].

Par contre, l'étude de l'influence de la température sur la réaction de fixation du complément a suscité de nombreux travaux dont les conclusions sont, souvent, divergentes. Pour certains auteurs (Kahn et Johnson [8], Kahn et Olin [9]) la vitesse de fixa-

tion augmente avec l'élévation de température ; ces expériences paraissant seulement qualitatives. Pour d'autres (Jacobsthal [10] et les auteurs employant sa technique, Guggenheimer [11], Altmann et Zimmern [12], Rubinstein [13]), l'adsorption de l'alexine par le précipité sérum-antigène est plus intense aux faibles températures (0°), mais la différence observée (2 p. 100) est trop faible pour qu'on puisse la considérer comme statistiquement significative [14]. Enfin, d'autres expérimentateurs (Thomsen et Boas [15], Lerrede et Rubinstein [16], Schwab [17], Zeissler [18]) concluent à une influence différente suivant la nature du sérum (syphilis latente, sérum de sujets traités) et préconisent d'effectuer la réaction successivement aux fortes et aux faibles températures.

Nous avons pensé que cette divergence de vue pourrait s'expliquer par le fait que ces recherches ont été effectuées de façon surtout qualitative et sans toujours dissocier la spécificité de la sensibilité. Nous avons repris cette étude en appliquant des méthodes physico-chimiques quantitatives à l'analyse des différentes variables, dans l'espoir d'obtenir, par des mesures précises, une meilleure compréhension du mécanisme de la réaction de Bordet-Wassermann.

MESURES DE L'ACTIVITÉ ANTIGÉNIQUE

I. PRINCIPE. — En utilisant avec un même sérum fortement positif et un système hémolytique constant, des quantités décroissantes d'antigène, on obtient, à partir d'une certaine concentration antigénique, des hémolyses régulièrement croissantes.

En portant sur un graphique (fig. I) en abscisse les dilutions d'antigène, et en ordonnée les hémolyses correspondantes (1), on obtient une courbe en S traduisant l'influence sur l'hémolyse de la quantité d'antigène introduite. *Pour un même sérum positif, un système hémolytique, un antigène donné et des conditions (t° et temps) identiques, cette courbe est remarquablement constante.* Si, conservant ces mêmes conditions, on utilise soit un antigène différent, soit le même antigène soumis à un agent physique (centrifugation, irradiation), on ne modifie pas la forme de la courbe, mais on observe son déplacement parallèlement à la courbe primitive. *La valeur de ce déplacement permet de mesurer de façon précise l'activité d'un antigène par rapport à un antigène choisi comme témoin.*

II. TECHNIQUE. — La méthode, décrite en collaboration avec H. Rocher [19], consiste à effectuer une réaction de Wassermann

(1) Mesurées photométriquement par la densité optique de la solution d'hémoglobine obtenue.

(technique de Debains) avec une série de dilutions au $\frac{4}{5}$ de l'antigène sur un même sérum fortement positif ; après centrifugation et décantation, les solutions d'hémoglobine sont photométrées (2). Au lieu d'utiliser, pour tracer la courbe, ces valeurs de l'hémolyse, il est avantageux de calculer le rapport d'hémolyse à l'hémolyse maxima d'un tube témoin (3). La courbe d'hémolyse obtenue passe aussi par l'origine des ordonnées (fig. 1) ; la limite pratique d'hémolyse nulle a ne dépend, à dose constante de complément, que du sérum et de l'antigène. Le maximum d'hémolyse b et la

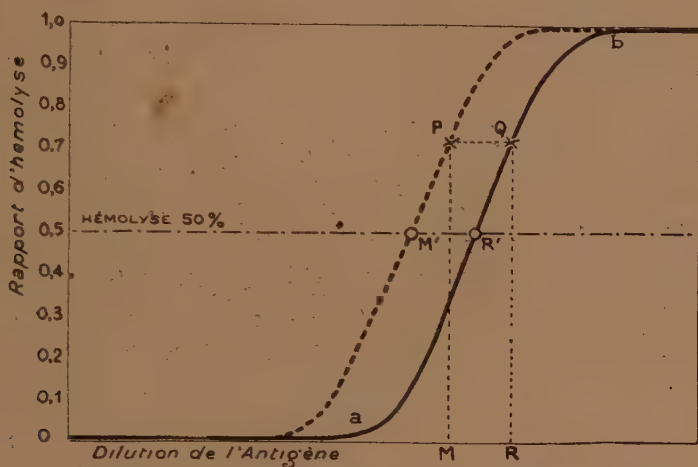


FIG. 1. — Méthode de détermination graphique de l'activité antigénique relative.

forme de la courbe ne dépendent que du système hémolytique employé.

L'utilisation du graphique logarithme — probabilité [20] permet de rendre cette courbe rectiligne (fig. 2) ; dans ces conditions, il est alors possible de caractériser toutes les courbes par deux valeurs : la pente et le point 50 p. 100 d'hémolyse. La pente ne variant pratiquement pas, la courbe peut être résumée entièrement par le point 50 p. 100 d'hémolyse.

Si dans ces conditions on soumet un antigène pris à la dilu-

(2) Photomètre de VERNES ou photolorimètre absolu de P. BOXÉT-MAURY, écran vert Wratten 74, épaisseur de la cuve 1 cm.

(3) Donnée par la formule $\frac{T_n}{T_n - T_o}$ où T_n représente la densité d'un tube à réaction, T_n , celle du tube témoin d'hémolyse maxima, sans antigène, T_o celle du tube témoin d'hémolyse minima (globules rouges + eau physiologique).

tion M, à une action quelconque, cet antigène donne un point figuratif d'hémolyse P ; en traçant les lignes de rappel P Q et Q R, on constate que son activité a varié dans un rapport M R. Mais, dans ce cas, le déplacement de la courbe n'est déterminé que par celui d'un seul point. On obtient une meilleure précision en déterminant plusieurs points de la nouvelle courbe et en interpolant graphiquement le point 50 p. 100 d'hémolyse. Le déplacement, c'est-à-dire la variation d'activité de l'antigène, est alors mesuré par le rapport des points 50 p. 100 d'hémolyse.

III. INTERPRÉTATION DES COURBES D'HÉMOLYSE. — La courbe

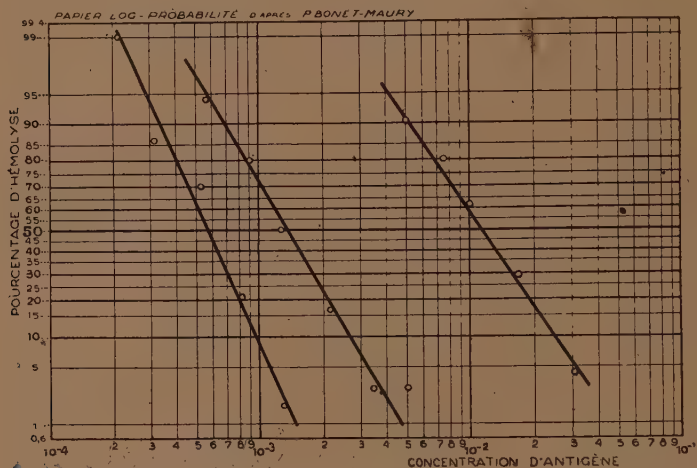


FIG. 2. — Courbes d'hémolyse en coordonnées logarithme-probabilité.

en S, constituant notre instrument de mesure, traduit l'influence de la concentration d'antigène sur l'hémolyse. Elle indique, en réalité, la quantité de complément libre en fonction de la dose d'antigène, dans une certaine zone *a b* (fig. 1) seulement. Avant *a*, l'antigène est en excès, et après *b*, la quantité d'antigène est trop faible pour assurer dans ces conditions la fixation du complément. La forme de cette courbe peut s'interpréter de façon simple, en faisant appel à des notions statistiques, comme nous l'avons fait avec P. Bonét-Maury [20]. En admettant que les hématies présentent vis-à-vis de l'agent hémolytique des résistances individuelles très inégales, la lyse de chaque globule rouge doit s'effectuer à partir d'une certaine concentration minimum du système hémolytique. Le pourcentage d'hématies détruites pour chaque concentration correspond alors à la proportion de globules incapables de résister. Le phénomène est absolument identique à

l'intoxication d'un groupe d'animaux par un toxique. En construisant les courbes d'hémolyse sur le graphique log-Probabilité utilisé en toxicologie [24], on obtient effectivement des droites justifiant ainsi l'interprétation proposée. La pente de la droite d'hémolyse a une signification biologique simple ; elle traduit la dispersion des résistances des hématies autour de la valeur moyenne, c'est-à-dire l'écart quadratique moyen ou la déviation standard. Elle peut naturellement varier d'un échantillon à l'autre.

DÉTERMINATION DE LA VITESSE DE RÉACTION.

On détermine cette vitesse en effectuant une série de réactions

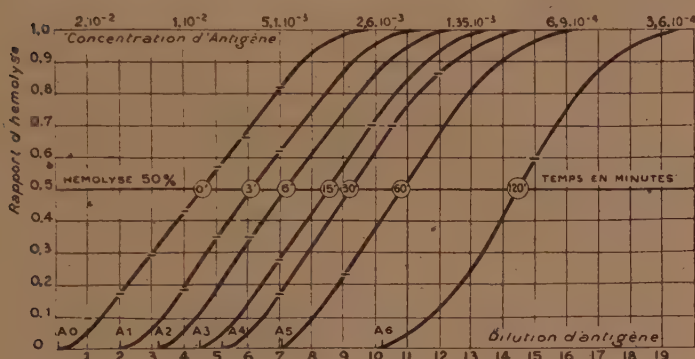


FIG. 3. — Courbes d'hémolyse, temps de fixation variable.

par la méthode décrite, ces réactions ne différant que par le temps de fixation du complément. On obtient alors une série de courbes parallèles (fig. 3), qui montrent clairement que la réaction de Bordet-Wassermann n'est pas instantanée, mais progresse régulièrement avec le temps.

On peut aussi préciser pour chaque temps de fixation, la quantité d'antigène (4) nécessaire pour fixer sans excès le complément. Cette quantité correspond à la concentration de la limite d'hémolyse nulle (point A_1, A_2, A_3, \dots) qu'on peut fixer avec précision, en prenant pour abscisse le double de celle du point 50 p. 100 d'hémolyse (5). Ces concentrations limites correspondent

(4) On détermine cette quantité soit en prenant l'échelle supérieure du graphique exprimée en concentration, soit en la calculant à l'aide d'une abaque concentration-dilution.

(5) L'expérience justifie cette méthode qui peut s'interpréter facilement du fait que la limite d'hémolyse nulle correspond à 100 p. 100 de complément fixé et le point 50 p. 100 d'hémolyse à 50 p. 100 de complément fixé, soit la moitié.

aux quantités $(a - x)$ d'antigène à transformer aux temps t_1, t_2, t_3, \dots . Il est nécessaire, pour calculer la vitesse de transformation de l'antigène, c'est-à-dire la quantité x d'antigène transformé à chaque temps t_1, t_2, t_3, \dots , de définir une concentration initiale a de l'antigène. Cette concentration est définie simplement par la limite d'hémolyse nulle A de la courbe de fixation instantanée (6).

On peut, avec ces données, tracer une courbe (fig. 4) en portant

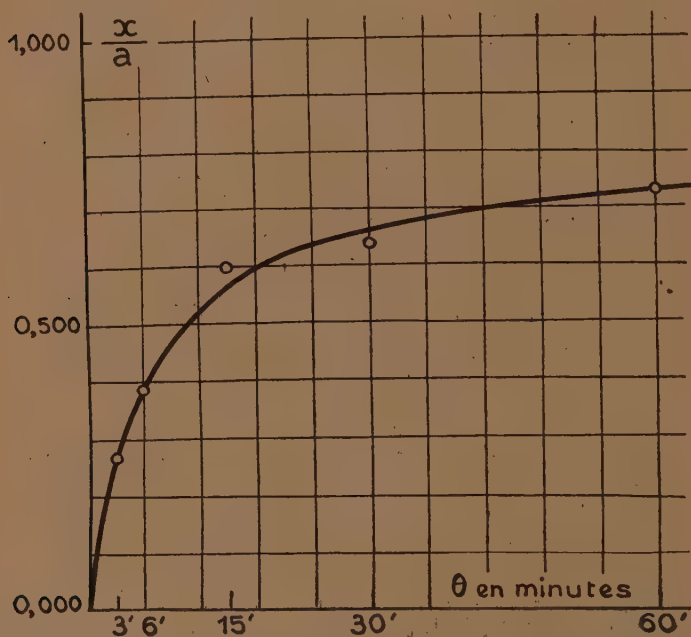


FIG. 4. — Courbe de vitesse de la réaction de fixation du complément.

en ordonnée le rapport $\frac{x}{a}$ et en abscisse, le temps de fixation. On obtient ainsi une courbe de transformation de l'antigène en fonction du temps passant par l'origine des coordonnées, dont on peut déduire pour chaque instant la vitesse de réaction. Cette courbe traduit bien l'allure progressive de la réaction de fixation du complément, et sa forme rappelle celle des courbes de réaction chimique. Elle correspond à la vitesse de fixation globale : antigène + réagine syphilitique + alexine.

(6) Cette limite correspondant à la quantité d'antigène fixant le complément sans excès dans un temps θ_0 . Ce point correspond au mélange instantané de tous les réactifs, avec mise à hémolyse immédiate.

Nous avons ensuite étudié les vitesses partielles de réaction (antigène + réagine syphilitique) puis (complexe [antigène + réagine] + complément) et constaté que la première de ces réactions est une réaction instantanée, tandis que les courbes de vitesse obtenues plus haut correspondent à la fixation progressive de l'alexine, sur le complexe réagine-antigène.

MESURE DE L'ORDRE DE RÉACTION.

L'analogie des courbes de vitesse observées avec celles des

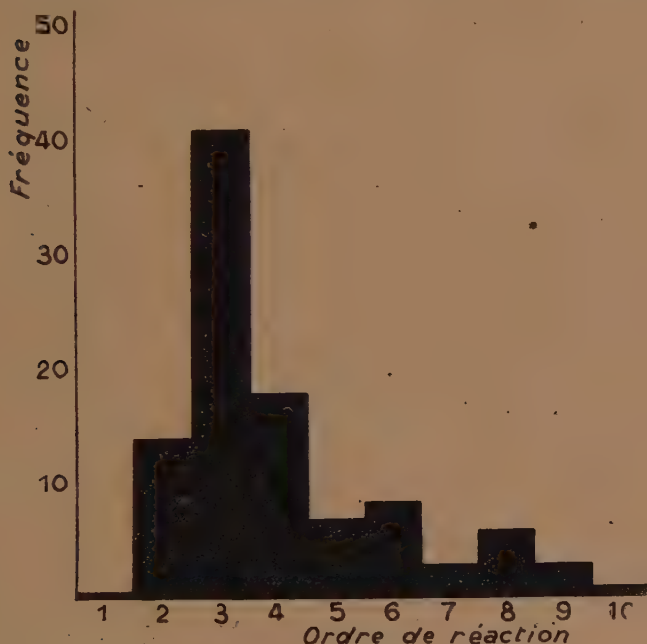


FIG. 5. — Polygone de fréquence des mesures d'ordre de réaction de fixation du complément.

réactions chimiques conduit à envisager une nature chimique de la réaction de fixation du complément. Nous avons, selon cette hypothèse, déterminé l'ordre de réaction possible d'une telle réaction. Pour cela, nous avons appliqué une formule classique de détermination de l'ordre de réaction :

$$n = 1 + \frac{\text{Log } \frac{N}{a'}}{\text{Log } \frac{a}{a'}} [22]$$

où a et a' représentent des dilutions différentes et θ et θ' les temps de demi-réaction correspondants, c'est-à-dire, dans notre cas, le temps d'hémolyse 50 p. 100. En appliquant cette formule à nos résultats expérimentaux, on obtient, quelle que soit la température, un certain nombre de valeurs dont la moyenne arithmétique est $n = 3$. La valeur la plus probable donnée par le mode et la médiane du polygone de fréquence (fig. 5), établi à partir de ces

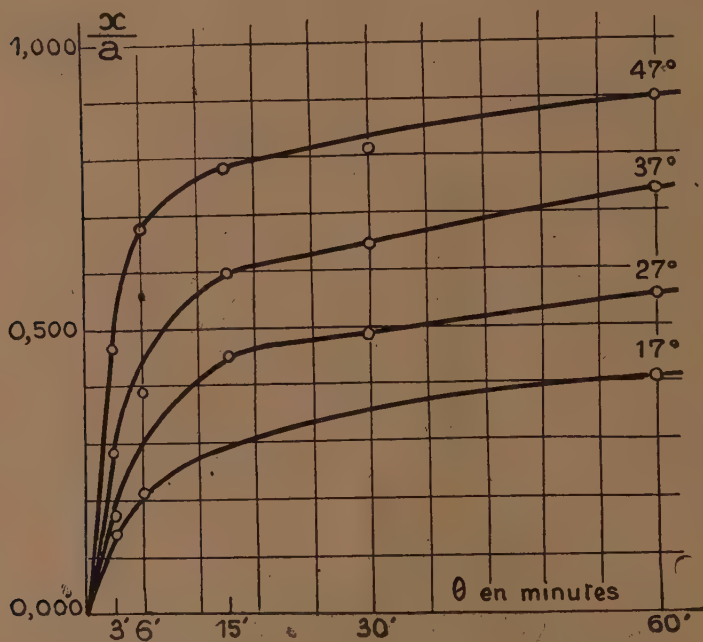


FIG. 6. — Isothermes de vitesse de fixation du complément.

valeurs, est aussi de $n = 3$, les écarts s'expliquant par l'imprécision relative de la méthode et la complication du cas étudié.

L'ordre de réaction trouvé $n = 3$, correspondant à une réaction trimoléculaire, cadrerait bien avec l'hypothèse simpliste de l'intervention d'une molécule de chacun des réactifs : réagine syphilitique, antigène et alexine. En réalité, comme nous le verrons par la suite, cette interprétation ne peut être retenue, les trois molécules précitées ne pouvant être identifiées, et nous sommes réduit à des hypothèses sur la nature exacte des molécules réagissantes, par exemple, un molécule de complexe antigène-réagine se combinant à deux molécules d'alexine.

Il ressort donc de cette partie de notre travail, que la réaction de fixation du complément est une réaction progressive et qu'elle

semble, d'après l'analogie des courbes de vitesse, pouvoir être de nature chimique (son ordre 3 correspondant à une réaction trimoléculaire). D'autre part, nous avons montré que seule la seconde réaction, fixation de l'alexine sur le complexe réagine-antigène, était progressive, la formation de ce complexe étant instantanée.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LES VITESSES DE RÉACTION.

Nous avons étudié ensuite l'influence de la température sur la vitesse de fixation du complément. La technique est identique à celle précitée, et consiste à effectuer comparativement la fixation durant des temps différents à diverses températures. Nous avons étudié aussi la vitesse de fixation entre 0° et 56° ; celle-ci est une température limite, le complément étant complètement inactivé. On constate, d'une manière générale, une augmentation nette et de la quantité totale fixée et de la vitesse de cette fixation, avec l'élévation de température. La figure 6 montre les courbes de vitesse correspondant à 17°, 27°, 37° et 47°. L'allure générale des courbes reste identique, ce qui montre l'identité du phénomène, prouvée d'autre part, par la constance de l'ordre de réaction $n = 3$ à toute température.

Nous avons cherché à vérifier si la fraction de l'alexine suivait la loi expérimentale de Vant'Hoff [23] concernant l'influence de la température sur les vitesses de réaction. Nous avons, pour cela, calculé par la méthode graphique le Q_{10} (7), entre 17°, 27°, 37° et 47°. On trouve ainsi des valeurs comprises entre 1, 6 et 3, avec une moyenne de 2. La vitesse de fixation se trouve donc multipliée par un facteur de l'ordre de 2 pour une élévation de 10°.

Enfin, nous avons étudié l'influence de la température sur la formation instantanée du complexe antigène-réagine, et constaté qu'elle n'était nullement influencée par la variation de température.

Il ressort donc de ces expériences que le taux et la vitesse de fixation de l'alexine sont augmentés par l'élévation de température, contrairement à ce que pense Jacobsthal (*loc. cit.*). Cette partie de la réaction suit donc la loi de Vant'Hoff, alors que la réaction antigène + réagine n'est nullement influencée par la température.

CONCLUSIONS.

Sans préjuger de la nature de l'anticorps syphilitique, nous pouvons tirer de ce travail certaines conclusions sur le mécanisme probable de la réaction de fixation du complément dans la réaction de Bordet-Wassermann. L'étude des vitesses de réactions mon-

(7) Le Q_{10} , notion purement expérimentale, due à VANT'HOFF (*loc. cit.*) correspond à l'augmentation du phénomène (vitesse surtout) par élévation de 10°. Sa valeur signe la nature physique (Q_{10} = entre 0 et 1) ou chimique (Q_{10} = entre 1,5 et 3) d'un phénomène.

tre, tout d'abord, l'allure progressive de la réaction globale et son analogie avec les courbes de vitesse des réactions chimiques. Le calcul de l'ordre de réaction $n = 3$, correspondant à une réaction trimoléculaire, vient appuyer cette conception. D'autre part, en étudiant les vitesses partielles de réaction : (a) antigène + réagine syphilitique ; (b) (complexe [réagine-antigène] + alexine), nous constatons, la première réaction étant instantanée, que la vitesse de réaction globale observée correspond en réalité à la fixation de l'alexine sur le complexe.

L'étude de l'action de la température sur les vitesses de réaction, met en évidence la même différence entre les deux réactions et permet de préciser leur nature et leur mécanisme. Il ne semble pas que la fixation de l'alexine corresponde, comme le pense Bordet (*loc. cit.*), à un phénomène physique d'adsorption, car le Q_{10} observé compris entre 1,6 et 3, signe, conformément à la loi expérimentale de Vant'Hoff, la nature chimique de ce processus. D'ailleurs les phénomènes d'adsorption sont, au contraire, diminués par l'élévation de température [24]. C'est la première partie de la réaction, instantanée et non influencée par la température, qui semble plutôt de nature physique, par exemple une micro-floculation, comme on l'admet classiquement en sérologie. Dans un travail en cours, nous étudions ce mécanisme plus en détail.

En résumé, l'analyse cinétique de la réaction de fixation du complément conduit à envisager cette réaction comme la succession de deux réactions distinctes et de nature probablement différente :

1° La réaction de formation du complexe réagine syphilitique-antigène, qui semble de nature physique, si l'on considère sa rapidité et son indépendance vis-à-vis de la température ;

2° La réaction de fixation de l'alexine sur ce complexe, qui imprime à la réaction globale ses caractères. Cette réaction semble être, comme le prouve son Q_{10} caractéristique, de nature chimique. Cette réaction d'ordre $n = 3$, c'est-à-dire trimoléculaire, est progressive, réversible et paraît obéir aux lois classiques de la cinétique chimique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] EHRLICH et MORGENROTH. *Berl. Klin. Woch.*, 1899, 4 ; 1900, 453 ; 1901, 250-569-598.
- [2] BORDET (J.). *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*. Masson, édit., 1939, 466-482.
- [3] DEAN. *Zeit. f. Immun.*, 1912, 13.
- [4] RENAUX. C. R. Soc. Biol., 1923, 89, 92-96.
- [5] NICOLAU (S.) et RANGIU (A.). *Ann. Dermat. et Syphiligr.*, 1922, 3, 97, 6^e série. Voir aussi DEMANCHE (R.) : Les réactions sérologiques de la syphilis in *Traité de la Syphilis*, Doin et C^{ie}, édit., 1931, 2, 634-635.

- [6] ROCHER (H.) et CHOUTEAU (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 455 et 1942, **136**, 668.
- [7] ROCHER (H.) et CHOUTEAU (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 14.
- [8] KAHN et JOHNSON. *Journ. Infect. Diseases*, 1922, **31**, 416.
- [9] KAHN et OLIN. *Journ. infect. Diseases*, 1921, **29**, 630.
- [10] JACOBSTHAL. *Munch. Med. Wochen*, 1910, **13**, 689.
- [11] GUGGENHEIMER. *Munch. Med. Wochenschr.*, 1911, **26**, 1392.
- [12] ALTMANN et ZIMMERN. *Arch. für Derm. und Syph.*, 1912-1913.
- [13] RUBINSTEIN. *Traité pratique de sérologie et de sérodiagnostic*. Maloine, éditeur, Paris, 1932, 188-193.
- [14] FISHER. *Statistical Method of Research Workers*. Oliver and Byd, édit., London, 1938.
- [15] THOMSEN et BOAS. *Zeit. f. Immun.*, 1913, **18**, 516.
- [16] LEREDDE et RUBINSTEIN. *Bull. Soc. Méd. de Paris*, avril 1914.
- [17] SCHWAB. *Zeit. f. Immun.*, 1921, **32**, 87.
- [18] ZEISSLER. In *Bruck. Handb. der Sér. der Syph.*, 1924.
- [19] ROCHER (H.) et CHOUTEAU (J.). *Ces Annales*, 1941, **67**, 299.
- [20] BONÉT-MAURY (P.) et CHOUTEAU (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 614.
- [21] BONÉT-MAURY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 400.
- [22] VEZES (P.-M.). *Leçons de Chimie-Physique*, Vuibert, édit., Paris, 1929, 295.
- [23] VANT'HOFF. *Leçons de Chimie-Physique*, Herman, édit., 227.
- [24] BERTHOUD (A.). *Précis de Chimie-Physique*, Gauthier-Villars, édit., Paris, 359 et suite.

PHOTOMETRE DIFFÉRENTIEL POUR L'ENREGISTREMENT AUTOMATIQUE DES COURBES DE MULTIPLICATION BACTÉRIENNE (*)

par P. BONÉT-MAURY et R.-J. WALÉN.

*Institut du Radium : laboratoire Curie.
Institut Alfred Fournier : service du professeur Levaditi.*

L'enregistrement automatique des courbes de croissance bactérienne présente un intérêt certain, comme M. Faguet l'a montré dès 1932 (1). Son microbiophotomètre, permettant le tracé simultané de 6 courbes, a donné une première solution pratique du problème et permis d'aborder de nombreuses questions concernant les actions bactériostatiques ou bactériolytiques.

Nous avons, à notre tour, attaqué ce même problème pour le résoudre de façon différente et nous avons réalisé un appareil destiné à satisfaire plus particulièrement aux conditions suivantes :

1° Agitation mécanique continue de la suspension bactérienne pour assurer son aération et prévenir toute sédimentation au cours des expériences longues.

2° Construction d'une cuve optique étanche, facile à manipuler et à stériliser, permettant l'emploi du radon comme agent bactériostatique.

3° Détermination de la concentration microbienne à chaque instant par des mesures d'absorption, exprimées en unités absolues, c'est-à-dire en densité optique.

4° Utilisation d'un galvanomètre différentiel permettant d'enregistrer soit une courbe de croissance seule, soit une courbe traduisant la différence des vitesses de multiplication de deux cultures. Ce montage permet, en outre, de faire varier la sensibilité de l'appareil de façon très souple et d'agrandir toute partie de la courbe jugée intéressante.

(*) Association des Microbiologistes de Langue française, séance du 2 mars 1944.

(1) M. FAGUET. C. R. Ac. Sci., 1932, **194**, 1763 ; La photoélectrique dans l'enregistrement de la croissance bactérienne, 1941, Hermann, Paris. — M. FAGUET et NITTI. Ces Annales, 1943, **69**, 136.

DESCRIPTION. — 1° *Cuve d'observation photométrique* : Elle est constituée par deux tubes de Pyrex, soudés à angle droit (fig. 1) ; le tube A, large et court, est fermé par deux glâces de Pyrex à faces parallèles, optiquement travaillées et soudées au chalumeau. Ce tube renferme la suspension bactérienne et est traversé par le pinceau lumineux suivant son axe XY ; son volume

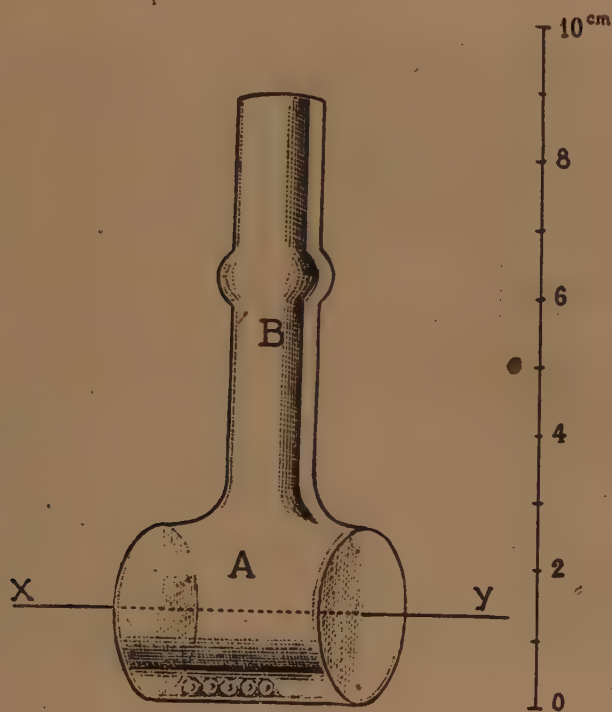


FIG. 1.

utile est de l'ordre de 8 à 10 c. c. et la distance des faces parallèles est égale à 25 mm. Le tube B, plus étroit et plus long, sert de voie d'accès pour les manipulations bactériologiques. L'ensemble de la cuve, entièrement soudée, est robuste, étanche et se manipule ou se stérilise exactement comme un tube à essai bactériologique. Elle est, pour l'étude des agents bactériostatiques chimiques, fermée par un coton stérile ; pour les irradiations par le radon, le col est effilé puis scellé, l'introduction du radon et de la culture s'effectuant suivant une technique déjà décrite (2).

(2) BONÉT-MAURY. *J. Chimie Physique*, 1942, 39, 116.

2° *Chariot porte-cuves* (fig. 2) : 12 cellules identiques sont placées en deux files parallèles de 6, dans les logements cylindriques d'un chariot en duralumin fondu. Ce chariot, monté sur roues, peut se déplacer sur deux rails parallèles ; son mouvement est assuré par un moteur électrique relié au chariot par un pignon et une crémaillère. Lorsque le chariot est arrivé au bout de sa course, un embrayage électro-mécanique relie le

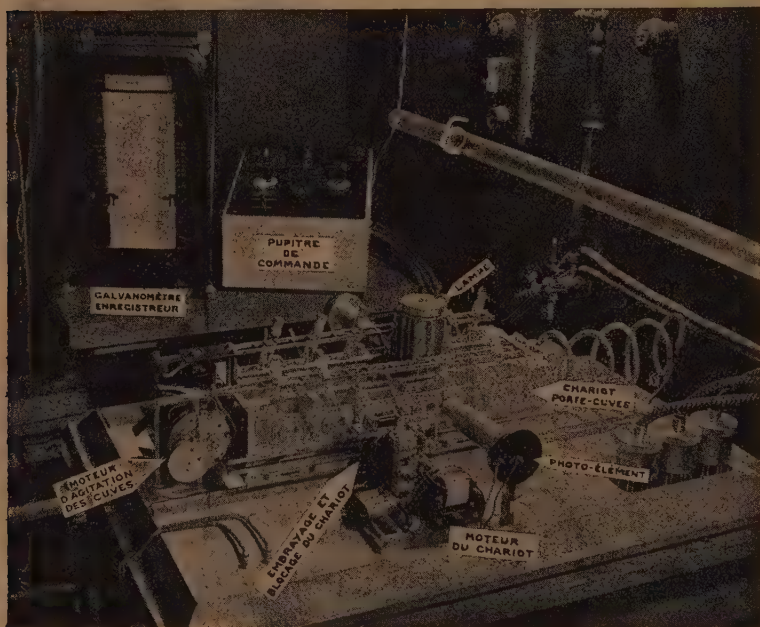


FIG. 2.

moteur à une deuxième crémaillère, placée sous la première et cette inversion de marche ramène le chariot à son point de départ.

3° *Agitation* : Une bonne agitation est indispensable pour obtenir des courbes de croissance régulières ; son rôle est double : assurer l'homogénéité biologique du milieu et empêcher la sédimentation de la suspension, faussant les mesures optiques. Chaque cuve peut être animée, dans son logement, d'un mouvement d'oscillation analogue à celui des fioles d'un respiromètre de Warburg. Ce mouvement d'oscillation est transmis par une tringle rigide, reliée aux cols des cuves par des colliers ; cette tringle est animée d'un mouvement de va-et-vient par un excentrique porté par l'arbre d'un moteur électrique, fixé sur le chariot. Le brassage de la suspension est amélioré par le dépla-

cement de billes de verre placées au fond de la cuve ; le contact avec l'oxygène de l'air s'effectue par une large surface, constamment agitée, obtenue en ne remplissant pas complètement la cuve A. Une agitation par courant gazeux est également prévue.

4° *Système optique* : Le flux lumineux est fourni par une petite lampe à filament ramassé, alimentée par un courant stabilisé au moyen d'un accu tampon chargé en permanence, soit par une batterie de grande capacité, soit par un redresseur. Cette lampe, placée entre les deux files de cellules, au centre du chariot, émet deux pinceaux de lumière dans des directions opposées. Chaque pinceau traverse une lentille, la cellule renfermant la suspension bactérienne, un diaphragme réglable et tombe finalement sur un photo-élément à couche d'arrêt situé à 15 cm. de la cuve (3). La lampe reste allumée en permanence pour assurer son fonctionnement en régime stable ; elle peut être masquée par deux petits volets, montés sur un même axe et manœuvrés par un électro-aimant. Les photo-éléments sont éclairés seulement le temps nécessaire à un enregistrement ; ils sont reliés au galvanomètre enregistreur.

5° *Galvanomètre enregistreur* : Le galvanomètre du type Pyrotère, de la Compagnie des Compteurs de Montrouge, est un appareil industriel, dont le cadre seul a été modifié : de faible résistance intérieure (60 ohms), il est divisé en deux enroulements distincts reliés chacun à un photo-élément. Les polarités étant inversées, le galvanomètre indique seulement la différence des courants qui le traversent et ne dévie pas s'ils sont égaux. La faible résistance du galvanomètre, les durées réduites d'éclairement des cellules, la faible puissance de la lampe ont été choisies pour réduire au minimum la fatigue photo-électrique et réaliser les meilleures conditions pour obtenir la proportionnalité flux lumineux-photocourant. Les deux cellules, sélectionnées spécialement, ont des caractéristiques très voisines.

Le galvanomètre est placé dans un boîtier métallique étanche et l'enregistrement des déviations de son aiguille s'effectue, par l'intermédiaire d'un ruban encreur, sur une bande de papier animée d'un mouvement uniforme par une horloge électrique. La vitesse de déroulement peut varier par échelons de 3 à 48 mm. à l'heure. L'appareil enregistre simultanément 6 courbes de couleurs différentes.

6° *Cycle des automatismes* : Les automatismes sont commandés par l'horloge électrique, placée dans le boîtier du Pyrotère, au moyen d'un système de relais (fig. 3), assurant tous les mouve-

(3) Dognon a très justement insisté dans ses travaux sur la photométrie des milieux troubles sur l'importance de la distance cuve-photoélément, pour la mesure correcte de la densité optique. (*Bull. Soc. Philomat.* Paris, 1941, 423, 51).

SCHEMA DU PRINCIPE DU FONCTIONNEMENT DU BIOPHOTOMETRE DIFFERENTIEL ENREGISTREUR

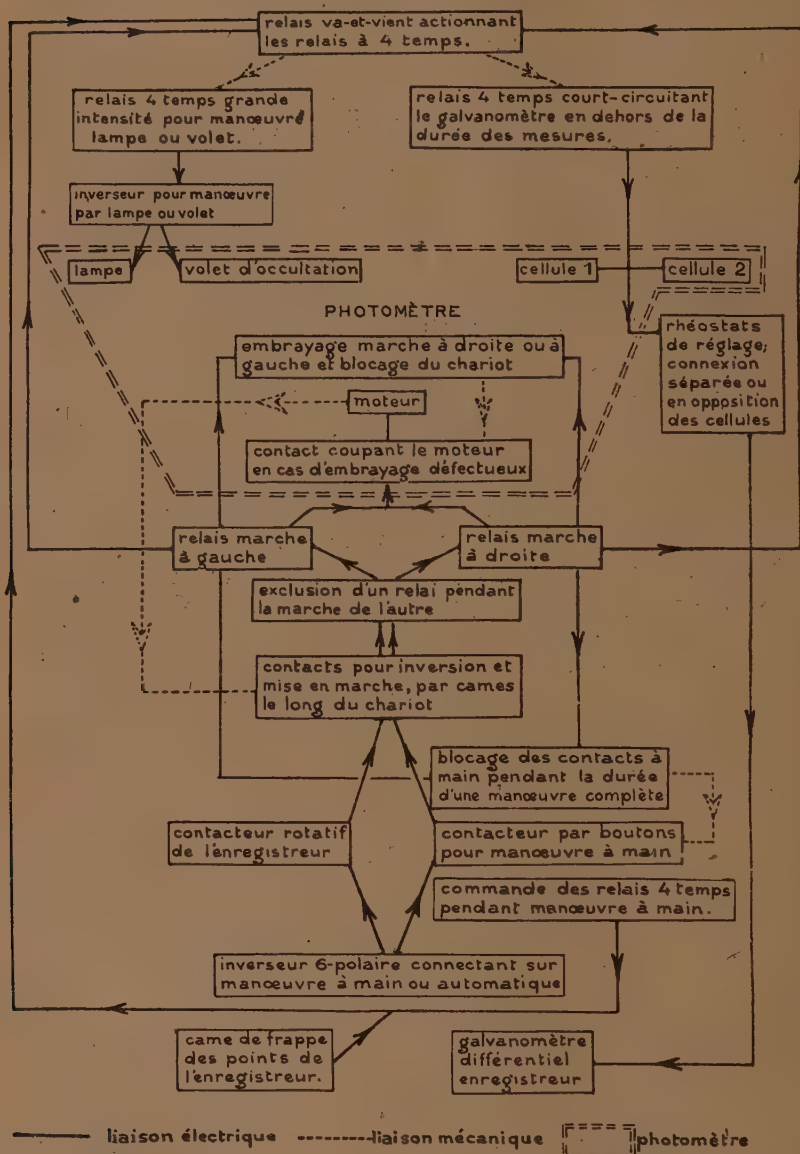


FIG. 3.

ments nécessaires. Toutes les minutes le chariot se met en marche, amène devant la lampe une paire de cuves et s'immobilise dans une position correcte, par verrouillage au moyen d'un électro-aimant puissant. Les volets, manœuvrés par leur électro-aimant, démasquent la lampe, la déviation du galvanomètre est enregistrée et les volets reprennent leur position primitive. Le même cycle se répète la minute suivante ; lorsque le chariot est arrivé devant la dernière paire de cuve, le moteur attaque la crémaillère inférieure et ramène le chariot à son point de départ. Chaque cuve ou paire de cuves donne donc un enregistrement toutes les six minutes.

6° *Pupitre de commande* : Toutes les commandes (interrupteurs, inverseurs, relais, potentiomètres, etc.) sont groupées sur un pupitre de commande, relié au galvanomètre et au plateau du chariot par des câbles souples, terminés par des broches démontables, permettant d'isoler les trois parties de l'appareil. Le galvanomètre et le pupitre de commande peuvent être placés en dehors de la chambre-étuve où fonctionne le photomètre. Le pupitre de commande porte 6 boutons poussoirs numérotés assurant les déplacements du chariot au cours des réglages préalables ; en appuyant sur l'un de ces boutons, le couple de cuves correspondant est automatiquement amené devant la lampe.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — 1° *Efficacité de l'agitation mécanique*. Au point de vue de l'homogénéité optique, nous avons vérifié cette efficacité en mesurant avec le photocolorimètre absolu (4) la densité optique de deux suspensions identiques au départ (environ 107 germes par centimètre cube) demeurées vingt-quatre heures à la même température (32°) ; l'une est agitée continuellement dans l'appareil, par le dispositif décrit et l'autre demeure immobile. Dans toutes les expériences la cuve non agitée, accuse une densité optique beaucoup plus faible, la différence entre les deux cuves pouvant atteindre 50 p. 100. Par contre, une agitation supplémentaire énergique de la cuve demeurée en mouvement ne modifie pas de façon appréciable sa densité optique. L'appareil mesure donc bien la densité optique maxima.

En ce qui concerne l'homogénéité biologique, le facteur le plus important pour les aérobies est l'aération suffisante du milieu. On obtient des courbes presque identiques en observant la croissance dans une cuve agitée mécaniquement et dans une cuve brassée par un courant d'air, introduit en bulles serrées par un tube de verre étroit. Même dans une cuve scellée, la courbe de

(4) Pour la mesure des troubles le photocolorimètre absolu (Jouan constructeur) est muni d'un dispositif spécial permettant d'obtenir la densité optique vraie, en éliminant le flux divisé vers le photo-élément par les particules éclairées.

croissance ne se distingue pas de celle de la cuve aérée au maximum, si l'on a soin de laisser au-dessus du milieu un volume d'air suffisant. L'étude de l'action bactériostatique du radon est donc possible, avec notre appareil, dans des conditions acceptables.

2° *Exemple d'enregistrement* : La figure 4 donne les courbes, calquées sur la bande enregistreuse, d'expériences faites en collaboration avec R. Pérault sur l'action d'un sulfamide (1162 F) sur *B. coli* en milieu synthétique. Les enregistrements simples, obtenus en utilisant un seul photo-élément, montrent des courbes très régulières ; la courbe en cloche représente un enregistrement différentiel obtenu en opposant deux cuves ayant reçu

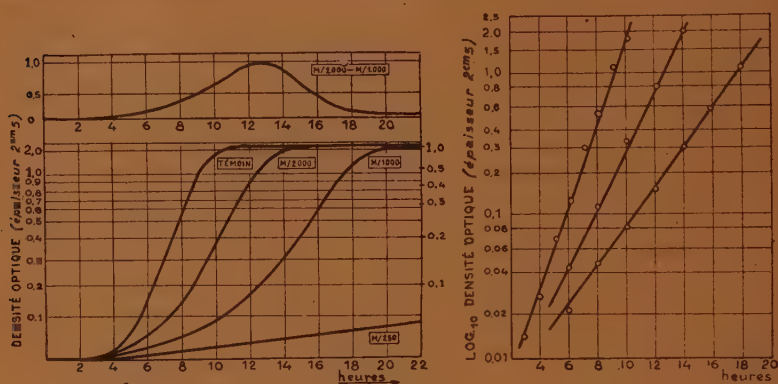


FIG. 4.

des quantités inégales de sulfamide (M/2.000 et M/1.000). Cette courbe montre clairement que la différence des vitesses, insensible au début de l'expérience, passe par un maximum, pour s'annuler finalement. Les concentrations bactériennes terminales étant identiques dans les deux cas, seul l'enregistrement continu permet de mettre en évidence la différence d'action de concentrations aussi voisines.

3° *Etalonnage de l'appareil en unités absolues* : Le graphique d'enregistrement a pour abscisses les temps, depuis le début de l'expérience, exprimés en heures, et pour ordonnées les courants traversant le galvanomètre, exprimés en micro-ampères. Au point de vue de la photométrie bactérienne, la grandeur intéressante est la densité optique, proportionnelle à la concentration en germes à chaque instant. On pourrait, par le calcul, passer des photocourants aux densités optiques, mais d'une part la proportionnalité éclairéments-courants n'est pas rigoureuse et d'autre part l'optique des milieux troubles obéit à des lois complexes.

C'est pourquoi nous avons étalonné directement l'appareil en utilisant des suspensions bactériennes de densités optiques connues, mesurées avec notre photocolorimètre absolu. L'échelle de gauche du graphique donne la densité optique de la cuve, c'est-à-dire pour une épaisseur de suspension de 25 mm., tandis que celle de droite donne le coefficient d'extinction, c'est-à-dire la densité optique déterminée dans une cuve de 1 cm. d'épaisseur (5). Pour passer au nombre de bactéries ou au poids de corps microbiens par centimètre cube, il faut faire un étalonnage pour chaque type de germe utilisé. A titre d'exemple, le vaccin T.A.B. Pasteur, renfermant $4,2 \times 10^9$ germes par centimètre cube, a une densité optique sous 25 mm. de 1,36 et un coefficient d'extinction de 0,600.

L'examen des ordonnées montre que la sensibilité de l'appareil est maximum pour le début des courbes et diminue progressivement. La partie initiale de la courbe présente un intérêt particulier, parce que son interprétation mathématique est simple ; en coordonnées semi-logarithmiques, elle apparaît rectiligne (fig. 4), traduisant bien une multiplication en progression géométrique.

4° *Applications* : Plus particulièrement conçu pour l'étude de la croissance microbienne et des actions bactériostatiques (radiations ionisantes, sulfamides, pénicilline, etc.), cet appareil se prête également à l'enregistrement automatique de tout phénomène se traduisant par une variation dans le temps d'une coloration ou d'un trouble.

(5) *Pour les suspensions bactériennes la densité optique ne varie pas linéairement avec l'épaisseur.* Institut du Radium et Institut Alfred-Fournier.

A PROPOS DU PHOTOMÈTRE DIFFÉRENTIEL DE MM. BONÉT-MAURY ET WALÉN

par M. FAGUET.

Nous avons donné dans plusieurs notes échelonnées de 1932 à 1943 (1) le principe et la technique de l'enregistrement photométrique des courbes de croissance microbienne au moyen de notre microbiophotomètre à deux, puis à six directions.

MM. Bonét-Maury et Walén ont cherché à résoudre le même problème et ils présentent aujourd'hui leur photomètre enregistreur.

Nous nous croyons autorisé par notre longue expérience de l'étude de ces problèmes à apporter ici quelques observations. Les solutions électriques notamment indiquées par ces auteurs pour l'enregistrement des cultures semblent inférieures à celles que nous avons données pour notre microbiophotomètre.

1° La source lumineuse de l'appareil de MM. Bonét-Maury et Walén est alimentée par une batterie d'accumulateurs de 12 volts, placés en tampons sur le courant secteur, ou s'il y a possibilité, sur une grosse batterie d'accumulateurs avec interposition d'une lampe fer-hydrogène.

Nous avons jadis étudié puis renoncé à ce mode d'alimentation que nous utilisions autrefois pour les premiers modèles de notre microbiophotomètre, car nous nous sommes bientôt rendu compte du manque de précision et des complications de réglage qu'apportait un tel système.

En effet, la stabilité du courant d'une source lumineuse ainsi alimentée dépend de plusieurs éléments : a), tension du secteur; b), redresseur; c), lampe; d), phénomènes variés se passant au sein d'une batterie d'accus au cours de sa décharge.

Nous avons constaté que ces éléments varient dans des sens qu'il n'est guère possible de prévoir et qu'il y a intérêt à faire un étalonnage fréquent du circuit. Tout au plus, peut on limiter les variations de la tension du secteur par la lampe fer-hydrogène et on peut s'estimer heureux si cette tension est stabilisée à 0,5 p. 100 près. Or le flux lumineux d'une lampe est proportionnel à la quatrième puissance de la température absolue et comme la puissance absorbée est proportionnelle au carré de la tension on peut se rendre compte de l'importance des variations auxquelles on doit s'attendre.

C'est l'une des raisons pour lesquelles nous avons remplacé le système d'alimentation par le secteur avec un accu tampon par une batterie d'accus dont la tension était étalonnée automatiquement toutes les cinq

(1) M. FAGUET, *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **194**, 1027 et 1763; 1935, **200**, 428 et 1637; *Ann. Ferment.*, 1935, **1**, 345; 1937, **3**, 276; *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 967; 1938, **128**, 969; *La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne*, Act. Scient. Ind., Hermann, édit., Paris, 1941, p. 898. — M. FAGUET et F. NITTI, ces *Annales*, 1943, **69**, 126.

minutes à 10^{-4} par un potentiomètre automatique enregistreur. De plus, cela nous évite tous les tâtonnements qui résultaient au début de chaque expérience de la recherche du milieu du palier horizontal de la courbe de décharge de notre batterie d'alimentation.

2° Les variations des indications fournies par un galvanomètre varient en fonction de la température. Son cadre en cuivre possède en effet un coefficient de variation de résistivité important puisqu'il est de $4/1.000$ par degré; ainsi, pour une variation de 10° , très fréquente dans une pièce non calorifugée, l'erreur peut atteindre de ce seul fait 4 p. 100. Ceci s'applique au fil de connexion reliant la cellule et le galvanomètre. Il est donc nécessaire que le galvanomètre enregistreur soit dans une chambre à température constante. Or, nous avons à peine besoin de signaler la gêne qui résulte de l'obligation de travailler dans une pièce chauffée à $37-38^\circ$.

De plus, MM. Bonét-Maury et Walen utilisent un galvanomètre enregistreur à pivot. Il y a là également une possibilité d'erreurs variables suivant le frottement du pivot. Ces erreurs sont, soit par excès lorsque l'aiguille va des valeurs maxima aux valeurs minima soit, par défaut, dans le sens inverse.

Ce sont ces raisons qui nous ont fait abandonner depuis déjà longtemps l'enregistrement par galvanomètre et nous l'ont fait remplacer par un potentiomètre automatique enregistreur dont les indications sont insensibles aux variations de la température et dont un montage spécial additionnel permet la stabilisation continue du courant d'alimentation de la source lumineuse à 10^{-4} près.

3° En ce qui concerne les cuves, MM. Bonét-Maury et Walen proposent un modèle que nous avons essayé, mais que nous avons dû abandonner parce qu'il ne nous a pas paru adapté à l'envoi d'un courant gazeux au sein de la culture, le moussage devenant très gênant dans des récipients aussi étroits. Nous avons dû adopter des cuves d'un modèle très différent.

4° De plus, nous utilisons pour l'enregistrement, des bandes de papier de 250 mm. et non de 120 mm. comme M. Bonét-Maury, parce que nous avons pu observer que certains phénomènes seraient passés peut-être inaperçus sur une courbe dont l'échelle des ordonnées aurait été trop réduite.

Ces considérations nous amènent à penser que les solutions apportées par MM. Bonét-Maury et Walen tant pour la régularisation de la source lumineuse que pour l'enregistrement lui-même du courant photoélectrique n'égalent pas celles de notre microbiophotomètre qui dans l'ensemble doit donner un enregistrement plus précis de la croissance des cultures microbiennes avec des manipulations plus réduites.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1944

par R. BÉQUIGNON et Ch. VIALAT.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, concerne l'année 1944.

1° *Personnes traitées.* 258 personnes se sont présentées à la consultation du Service des Vaccinations antirabiques. Chez 122 le traitement a été jugé nécessaire.

2° *Méthode de traitement.* La méthode employée est la méthode pastorienne (se reporter à ces *Annales*, juin 1941, 66, 483).

*
* *

Le virus fixe actuellement utilisé représentait, le 31 décembre 1944, le 1748° passage de la souche employée lors de la création du Service des Vaccinations Antirabiques, rue d'Ulm.

*
* *

3° *Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :*

France	121
Afrique du Nord	1

4° *Répartition des personnes traitées suivant l'animal mordeur :*

Chiens de propriétaires connus	30
Chiens errants	61
Chats de propriétaires connus	16
Chats errants	6
Rats	8

5° *Répartition des personnes traitées d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur :*

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen histologique ou par le développement de la maladie chez les animaux inoculés avec le bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par un examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A	0
Catégorie B	1
Catégorie C	121

Les névraxes de 67 animaux mordeurs ont été examinés par le Service des Vaccinations antirabiques. Trente-quatre fois les commémoratifs de la morsure de l'animal et le résultat de l'examen histologique du système nerveux nous ont autorisés à suspendre ou à interrompre le traitement chez les personnes mordues (V. dans ces *Annales*, juin 1943, 69, 372, les principes généraux qui ont dicté cette décision).

6° Répartition des personnes traitées d'après les caractères de la morsure :

Profondes	80
Superficielles	42

7° Répartition des personnes traitées suivant que les vêtements ont été interposés ou non :

Peau nue	83
Vêtements interposés	39

8° Répartition des personnes traitées d'après le siège de la morsure :

Tête	5
Membres supérieurs	66
Trouc	1
Membres inférieurs	49

9° Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :

0 à 4 jours	58
5 à 7 jours	30
8 à 14 jours	15
15 à 21 jours	9
Plus de 21 jours	10

10° Autres renseignements :

Pour la formule du traitement et le tableau récapitulatif des résultats généraux des vaccinations depuis l'origine, v. ces *Annales*, loc. cit.

Répartition par départements des personnes traitées à l'Institut Pasteur.

Allier	1	Maine-et-Loire	1
Alpes-Maritimes	1	Manche	1
Calvados	1	Marne	3
Cantal	2	Mayenne	1
Corrèze	3	Nièvre	1
Côtes-du-Nord	2	Oise	2
Doubs	1	Rhin (Bas-)	1
Eure	1	Sarthe	1
Eure-et-Loir	1	Seine { Paris	52
Finistère	1	{ Banlieue	23
Garonne (Haute-)	1	Seine-et-Marne	2
Ille-et-Vilaine	1	Seine-et-Oise	9
Landes	1	Sèvres (Deux-)	2
Loire (Haute-)	1	Vienne	1
Loire-Inferieure	1	Yonne	1
Lot-et-Garonne	1		

11° Mesures prises en vue de poursuivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum :

Les médecins et les vétérinaires sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° Accidents paralytiques : néant.

13° Décès : néant.

La statistique pour 1944 est donc ainsi établie :

Personnes traitées	122
Mort.	0

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 13 avril 1944.

COMMUNICATIONS' (SUITE ET FIN)

RÉACTION D'ALLERGIE TUBERCULINIQUE ET ACIDE GRAS α - α DISUBSTITUÉS

par JEAN PARAF et JEAN DESBORDES.

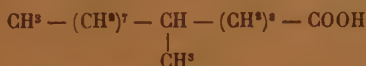
Il est maintenant presque universellement admis que la sensibilité tuberculinique est liée à la présence dans l'organisme de tissu tuberculeux, et la plupart des auteurs attribuent à ce tissu un rôle prépondérant.

Il était également admis que c'étaient les protéines du bacille qui étaient responsables de l'état allergique et des réactions qu'il déclenchait.

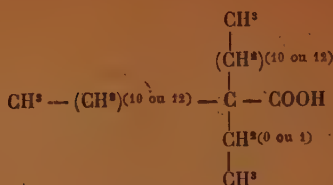
Cependant, depuis quelques années, à la suite des travaux de Machebœuf et ses collaborateurs, d'Anderson et de ses élèves, de Robinson, de Sabin, de ceux plus récents de Nine Choucroun, on a été amené à attribuer aux lipoides un rôle de premier plan. En particulier Sabin, puis Robinson ont insisté sur le rôle des acides à longues chaînes, plus ou moins saturés, avec de nombreuses ramifications.

Par ailleurs, le rapprochement des effets activateurs sur les lésions tuberculeuses du Cobaye, par l'acide oléique, alors que les dérivés stéariques (Nègre, Berthelot et Bretey) ont une action retardatrice sur ces mêmes lésions, permettent d'incriminer le rôle de la double liaison.

Un pas décisif a été fait depuis que les auteurs français B. Hoï et P. Cagniant et leurs collaborateurs ont pu préparer des acides gras α - α disubstitués ayant une parenté très étroite avec les principaux acides retirés jusqu'ici du bacille de Koch :

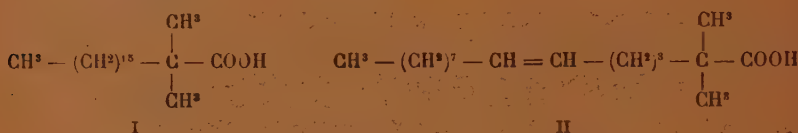


Acide tuberculostéarique du B. K.



Acide phtioïque du B. K.

Ces auteurs ont montré que les acides qu'ils avaient préparés, du type I avaient des effets tuberculinisants sur le Cobaye, et que les acides du type 2 avaient des effets à la fois toxiques et tuberculinisants. Nous-mêmes, en collaboration avec ces mêmes auteurs, avons montré que de tels acides étaient capables de provoquer un certain degré d'allergie chez le cobaye et de déclencher un phénomène de Koch léger mais net.

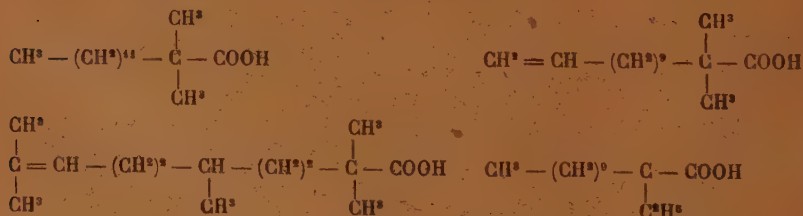


Types d'acides synthétisés par B. Hol et P. Cagniant.

Dans ces conditions nous avons été amenés à penser que, contrairement à l'opinion courante, ce n'étaient pas forcément les protéines qui déclenchaient les réactions tuberculiniques, mais plutôt les acides gras α - α disubstitués.

Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons interrogé l'allergie de nos malades avec ces derniers corps en pratiquant des intradermo-réactions. Les faits expérimentaux ont effectivement répondu à notre interprétation : ces corps sont capables de déclencher une réaction positive chez des sujets en état d'allergie manifeste. Nos premiers essais ont même été pratiqués chez une malade adulte en état d'hyperergie et porteuse d'un érythème noueux.

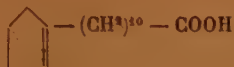
Sur 8 acides étudiés, nous avons eu une réponse positive chez la *totalité* des acides mono ou disubstitués en α , avec ou sans double liaison : ce sont les corps dont les formules suivent :



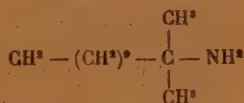
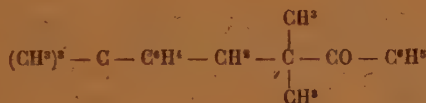
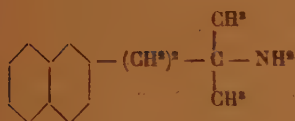
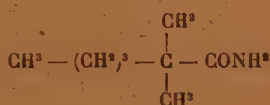
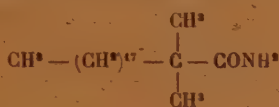
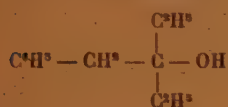
Par contre les acides en chaîne droite, saturés ou non, sans ramification, nous ont toujours donné une réponse négative. Ce sont les acides oléique, linoléique, palmitique, stéarique.

Un acide possédant un cycle dans sa chaîne et possédant une double

liaison nous a toujours donné une réponse faiblement positive ; c'est l'acide hydnocarpique :



Il semble donc qu'une telle réaction allergique soit plus imputable à la ramification, au voisinage de la fonction acide qu'à la saturation ou non de la chaîne carbonée. Néanmoins celle-ci doit avoir une certaine longueur et varier peu autour de 13 à 19 atomes de carbone au minimum. Des réactions pratiquées avec d'autres fonctions (alcool, amide, cétone, amine) possédant cependant des ramifications diverses (éthyle, méthyle) au niveau de ces fonctions (position α), avec ou sans cycles inclus dans les chaînes carbonées nous ont, jusqu'à présent, donné des résultats négatifs. Tels sont les corps :



Les intradermo-réactions étaient pratiquées avec une dose de 500 γ du corps en solution dans l'huile d'olive.

(Hôpital Bichat.)

Séance du 4 mai 1944.

COMMUNICATIONS (SUITE ET FIN)

**RELATIONS ENTRE L'INSOLUBILITÉ
DE LA SUBSTANCE GRANULAIRE DU BACILLE DE KOCH
ET LES ASPECTS PRINCIPAUX
DE LA RÉACTION DE L'ORGANISME
A L'INFECTION TUBERCULEUSE**

par R. LAPORTE.

Un fait domine l'histoire du pouvoir pathogène des bacilles tuberculeux : la conservation par les corps microbiens morts d'une grande partie des propriétés toxiques et sensibilisantes des germes vivants. Une autre particularité non moins remarquable a retenu très tôt l'attention des chercheurs : c'est la persistance pendant plusieurs mois des bacilles morts parfaitement intacts en apparence dans les tissus vivants d'un animal sensible. *In vivo* comme *in vitro*, les substances toxiques liées aux corps microbiens résistent énergiquement ; on ne peut parvenir à les supprimer qu'au prix de la destruction brutale des bacilles.

A quels constituants bacillaires ces propriétés toxiques si remarquablement fixes sont-elles attachées ? Les études chimiques consacrées à la composition du bacille tuberculeux ont porté presque exclusivement sur des produits d'extraction : lipides, protéides, polysides. Certaines de ces fractions possèdent des propriétés biologiques importantes tout spécialement du point de vue antigénique. Mais, à la suite de ces extractions aussi poussées soient-elles, il a bien fallu se rendre à l'évidence que le résidu insoluble contient toujours la majeure partie des propriétés tuberculigènes et sensibilisantes des bacilles totaux. Pour les lipides, par exemple, à la suite des recherches de Sabin et de ses élèves sur les réactions tissulaires provoquées par les fractions lipidiques qu'Anderson a isolées, certains constituants : phosphatides, acide phthioïque, ont été incriminés comme agents tuberculigènes actifs (1). Mais Sabin a constaté elle-même que les bacilles délipidés par toute une série de solvants organiques conservent l'intégralité de leur pouvoir pathogène originel (2). Bien plus, si l'on traite par un

(1) F. SABIN, C. DOAN et C. FORKNER, *J. exp. Med.*, 1930, 52, suppl. n° 3 ; voir aussi : F. ROULET et K. BLOCH, *Virchow's Archiv*, 1936, 298, n° 2, 311.

(2) R. SABIN et A. L. JOYNER, *J. exp. Med.*, 1938, 68, 853 ; voir aussi : BOISSEVAIN, *Amer. Rev. Tuberc.*, 1923, 7, 88 ; R. LAPORTE, *C. R. Soc. Biol.*, 1940, 133, 63.

acide fort (HCl) ces bacilles délipidés, on peut en extraire un dernier reste lipidique fortement lié et le résidu insoluble n'exerce plus *in vivo* qu'une action inflammatoire qui semble banale ; mais il suffit de s'opposer à une résorption rapide de ces éléments modifiés par l'action de l'acide, en les inoculant enrobés dans une huile minérale, pour voir réapparaître absolument intacts leurs propriétés biologiques spécifiques. D'après nos expériences, si l'on extrait totalement les lipides bacillaires en épuisant par l'éther et le benzène bouillant au Kumagawa des corps microbiens préalablement traités par HCl à 25 p. 100 (3) et si l'on enlève dans un second temps les substances solubles dans l'eau et dans la soude diluée, on obtient encore un résidu insoluble de l'ordre de 60 p. 100 de la masse bacillaire traitée. Ce résidu entièrement dépourvu d'acido-résistance est constitué, d'une part, par des débris microbiens et, d'autre part, par la substance granulaire dont nous avons déjà signalé la présence générale dans les résidus d'autolyse des cultures. Si l'on inocule au cobaye, par voie ganglionnaire, les restes bacillaires ainsi préparés, à la dose de 1 mg. émulsionnée dans de l'huile de paraffine, on confère en quelques jours à l'animal un état d'allergie tuberculinique très intense ; en outre, des lésions se développent dans les poumons sous forme d'un semis de granulations miliaires persistant pendant plusieurs mois.

Il semble bien, par ailleurs, que l'on puisse préciser où se localise dans le résidu précédent l'activité toxique des corps microbiens. L'étude du processus d'autolyse en donne le moyen tout en rendant compte de la façon dont peut s'exercer *in vivo* la libération du complexe résiduel toxique. Nous avons vu que l'autolyse des bacilles aboutit à la diffusion de substances solubles, protéïdes et polysides, et à la libération de corpuscules non acido-résistants. On peut isoler ces derniers en soumettant à une centrifugation prolongée une émulsion dans de l'eau distillée de bacilles autolysés (4). La substance granulaire ainsi préparée, puis purifiée, possède, ainsi que nous l'avons établi, des propriétés tuberculigènes, sensibilisantes et antigéniques marquées ; l'étude de sa composition chimique qui est en cours nous fixera peut-être sur la nature exacte de l'antigène complet qu'elle renferme. Nous voudrions insister seulement ici sur la résistance si particulière des granules aux tentatives de destruction et de solubilisation totale. Sans doute, certains solvants, tels ceux utilisés pour l'extraction des lipides : alcool, éther, chloroforme, benzène, ou encore l'eau ou la soude diluée agissant après délipidation, entraînent des produits solubles mais laissent persister un résidu important dans lequel on retrouve l'activité biologique originelle. Signalons que même les acides minéraux concentrés, sauf toutefois l'acide sulfurique, se montrent également incapables de dissoudre ces granules et n'en altèrent les propriétés biologiques qu'après plusieurs heures de contact ; il en est de même pour l'acide formique, dont Loiseleur a observé le remarquable pouvoir solvant envers les complexes protidiques (5).

(3) Ce traitement par HCl est indispensable pour parvenir à une délipidation totale.

(4) R. LAPORTE, C. R. Acad. Sci., 1941, 212, 138.

(5) J. LOISELEUR, Bull. Soc. Chim. biol., 1932, 14, 1088.

Cet antigène granulaire résiste à un chauffage pendant plusieurs heures à 130° à l'autoclave ou à 200° à sec. Une exposition massive aux rayons U. V. laisse persister l'essentiel de ses propriétés toxiques, altérant seulement l'activité réactionnelle d'ordre tuberculinique. Des alternances répétées de congélation et de réchauffement, depuis la température de l'air liquide jusqu'à + 40°, des antiseptiques comme les sels de mercure et le formol ne modifient pas non plus les propriétés biologiques de la substance granulaire. Même résistance remarquable à l'action des ferments protéolytiques qui semblerait devoir s'exercer sur une substance dont la teneur en N est de l'ordre de 9 p. 100 : la pepsine et la papaïne paraissent totalement inactives, la trypsine a une action liquéfiante partielle mais le résidu insoluble est encore biologiquement actif. Remarquons en passant que les protéases du bacille n'attaquent pas non plus la substance granulaire puisqu'ils en permettent, au contraire, l'isolement en provoquant la désintégration des corps microbiens.

La résistance si considérable à toute tentative de destruction ou de dissolution qui caractérise la substance granulaire résiduelle du bacille de Koch constitue une particularité remarquable, sans doute unique dans l'histoire des microbes pathogènes. Cela nous incite tout naturellement à rechercher dans ce fait l'explication au moins partielle de l'allure spéciale des réactions biologiques provoquées par l'infection tuberculeuse. Quel que soit le mécanisme par lequel s'opère *in vivo* la désintégration des bacilles : processus d'autolyse ou action agressive de la part des cellules inflammatoires, ce phénomène aboutit à la libération lente et entretenue des granules dont l'action toxique se manifeste sur les tissus ambiants. Il s'ensuit, d'une part, une réaction mésenchymateuse progressive d'un type particulier et, d'autre part, une réponse antigénique non moins spéciale : l'allergie tuberculinique dont les caractères semblent bien liés à la nature spéciale de l'allergène. C'est, en effet, le complexe granulaire résiduel insoluble qui paraît constituer la tuberculine véritable, à la fois agent de sensibilisation de l'organisme et substance déclenchant les réactions allergiques ; les protéides tuberculins solubles ne possédant, à un degré sensiblement égal, que la seconde de ces propriétés.

Il n'est pas jusqu'aux caractères particuliers des réactions immunitaires dans la tuberculose qui ne puissent trouver une explication dans l'existence de la substance granulaire insoluble. Le processus antigénique et la formation consécutive d'anticorps neutralisants ne peuvent évidemment s'opérer pour ce complexe insoluble suivant les mêmes modalités que pour une toxine soluble. Peut-être est-ce là une raison de l'insuffisance manifeste de l'immunité humorale dans l'infection tuberculeuse. On peut encore remarquer que cette résistance de la substance granulaire aux actions destructrices explique la persistance des éléments toxiques dans les lésions tuberculeuses d'une façon beaucoup plus séduisante que l'hypothèse si souvent admise *a priori* d'une carapace cirreuse protégeant le bacille contre l'action des sucs cellulaires.

Comment concevoir la libération granulaire *in vivo* ? La réponse à cette question nous semble fournie par les observations au microscope

électronique. Wessel (6) a constaté que les granules et les microgranules rendus visibles dans l'intérieur du bacille par cette technique d'observation s'accroissent avec l'âge des éléments puis disparaissent, le bacille semblant se vider de sa substance en libérant les granules. Malgré cela, l'aspect après coloration, dans les conditions ordinaires d'observation, est encore apparemment normal, ce qui explique la longue persistance de la forme des bacilles dans les tissus. Ultérieurement, ainsi qu'on l'observe dans les cultures, le squelette résistant doit aussi se désintégrer, ce dernier acte du drame pouvant nécessiter plusieurs mois ou peut-être plusieurs années avant de s'achever.

En résumé, nous croyons pouvoir conclure en l'état actuel de nos recherches que :

1° La partie principale de la toxicité du bacille tuberculeux semble localisée dans une substance de nature granulaire caractérisée par son insolubilité et sa résistance extraordinaire aux agents de destruction.

2° Ces deux caractères de l'élément toxique le plus important de l'agent microbien sont de nature à nous expliquer l'allure particulière des réactions du sujet infecté : l'allergie, la formation du tissu tuberculeux et l'absence pratique d'immunité d'ordre humoral.

(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la Tuberculose.)

COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE AU COURS DE SON DÉVELOPPEMENT DANS L'EAU DE SEINE AUTOCLAVÉE EN L'ABSENCE DE MULTIPLICATION BACTÉRIENNE

par A. GUELIN.

Dans une communication précédente (1), j'ai montré que le bactériophage pouvait présenter une augmentation de titre, sans multiplication bactérienne concomitante.

Ce phénomène était observé dans des échantillons autoclavés d'eau (prélevés dans une des stations de la Commission du Bassin de la Seine), dans lesquels on introduisait par la suite un bactériophage, et une suspension des bactéries sensibles. On avait constaté dans les jours qui suivirent une baisse progressive du nombre des bactéries et en même temps une augmentation considérable du titre bactériophagique.

Cette augmentation ne présentait pas un caractère régulièrement progressif. Après une baisse continue du titre, au cours de la pre-

(6) E. WESSEL, *Zeitschr. Tuberk.*, 1942, 88, 22.

(1) A. GUELIN, *Ass. Microb. L. Fr.*, séance du 3 mars 1944.

mière décade, il se produisait vers le neuvième ou le dixième jour un retour brusque au niveau précédent, suivi d'une nouvelle augmentation.

Il m'a semblé intéressant de chercher ce que devient le bactériophage pendant cette période. L'hypothèse de sa destruction m'a semblé peu satisfaisante, à cause du redressement brusque de la courbe.

Tout semblait se passer comme si le bactériophage se trouvait peu à peu dissimulé, et, de ce fait, impossible à mettre totalement en évidence par la méthode habituelle de titrage. Et c'est aux bactéries qu'on doit penser en premier, quand on envisage le lieu de cette dissimulation. Cela m'a conduit à étudier le rôle joué par celles-ci, dans la disparition périodique du bactériophage, et pour commencer, je me suis proposé d'établir la quantité de bactériophage fixé sur les cellules

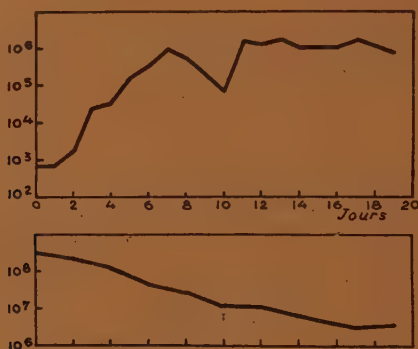


FIG. 1 (moyenne de six expériences A). — Développement du bactériophage (en haut) dans l'eau autoclavée de la Seine. On voit la baisse à partir de sept jours et le redressement rapide au dixième jour. La courbe des bactéries (en bas) descend toujours.

pendant les dix premiers jours de son développement dans l'eau autoclavée.

Comme méthode, j'ai employé tour à tour la centrifugation et le chauffage à 56° (le bactériophage en question résiste trente minutes à 56°). On sait que la quantité du bactériophage total (c'est-à-dire la somme des phages fixés sur les bactéries et des phages libres) diminue et par centrifugation et par chauffage à 56° : la centrifugation élimine les phages fixés sur les bactéries, puisque ces dernières sont retranschées du liquide ; le chauffage élimine les phages en les bloquant sur les bactéries tuées par la chaleur.

Ainsi dans le liquide chauffé ou dans le liquide décanté après centrifugation, il ne reste que le bactériophage libre, extracellulaire. La quantité totale du bactériophage diminue. Par soustraction, on peut déduire la quantité de phages fixés sur les cellules.

Dans chacune des expériences, le bactériophage Bordet (variante Y) est mis en présence du *B. coli* (souche Burnet) dans 30 c. c. d'eau de Seine autoclavée. Le tout est porté à 37°. Au départ, il y a toujours

environ 10^8 bactéries par centimètre cube. Les titrages sont effectués par les méthodes habituelles de numération des colonies et des plages.

Chaque jour on prélève une petite quantité d'eauensemencée ; le bactériophage et les bactéries sont titrés. 1 c. c. de cette eau prélevée est chauffé à 56° au bain-marie ou centrifugé pendant quinze minutes (6.000 tours par minute). On titre le bactériophage dans le liquide chauffé et dans le liquide décanté après la centrifugation.

D'après ces résultats, entre le quatrième et le dixième jour environ, c'est-à-dire pendant la baisse de la courbe du bactériophage total, on ne constate pas une diminution, mais au contraire, une augmentation du titre du bactériophage libre après la centrifugation et après le chauffage. Le culot bactérien après la centrifugation ne contient que quelques corpuscules-bactériophages.

Cette augmentation du bactériophage après le chauffage et la centrifugation peut être expliquée par la libération des phages qui se trouvent à la surface ou à l'intérieur des bactéries.

Cette libération du bactériophage, non observée dans les conditions habituelles, peut être provoquée, dans mes expériences, par des causes différentes, parmi lesquelles on peut envisager le milieu spécial (l'eau de Seine, pauvre en éléments nutritifs et en électrolytes) et le vieillissement des bactéries qui ne se multiplient pas et qui ainsi libéreraient peut-être plus facilement le bactériophage fixé.

Variations du titre du bactériophage, pendant son développement dans l'eau autoclavée de la Seine, avant et après chauffage (moyenne des deux expériences C1 et C2).

JOURS	TITRE DU BACTÉRIOPHAGE		BACTÉRIES (en millions)
	Avant chauffage	Après chauffage	
0.	500		200
2.	13.880	3.340	
3.	119.000	89.000	185
4.	102.000	89.000	142
5.	69.000	142.600	172
6.	65.200	234.000	80
7.	29.200	197.000	50
8.	19.200	103.000	36
9.	48.000	180.000	29
10.	318.000	307.000	
11.	345.000	255.000	14
12.	250.000	292.000	4
13.	217.000	180.000	4
14.	200.600	170.000	

Ces résultats inattendus des expériences n'ont donc pas permis d'établir la quantité des phages fixés pendant les premiers dix jours du développement. Mais ils donnent quand même la réponse à la question posée au début de ce travail : que devient le bactériophage pendant sa

baisse au cours de la première décade ? Le bactériophage ne disparaît pas ; il se trouve dissimulé à la surface ou à l'intérieur des bactéries et est ainsi hors d'état d'être mis en évidence par le titrage. Il peut être libéré en partie par la centrifugation ou par le chauffage à 56°. A la fin de la première décade, le bactériophage libéré présente, de nouveau, la baisse et le redressement de la courbe de croissance signalés plus haut pour le bactériophage total. S'agit-il ici d'un véritable cycle de développement du bactériophage, soit à la surface, soit à l'intérieur des bactéries ? Cette question importante, comme beaucoup d'autres

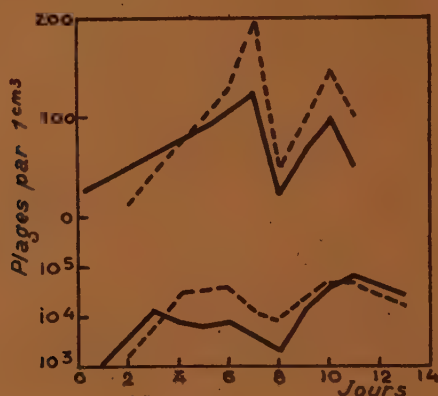


FIG. 2 (moyenne de deux expériences C3 et C4). — Variations du titre du bactériophage pendant son développement dans l'eau autoclavée de la Seine, avant (—) et après (-----) chauffage (en haut); avant (—) et après (-----) centrifugation (en bas). On voit dans les deux expériences la baisse de la courbe, durant la première semaine, et le redressement vers le neuvième-dixième jour.

qui se trouvent posées au cours de ce travail, demande des expériences nouvelles.

RÉSUMÉ. — Pendant le développement du bactériophage dans l'eau de Seine autoclavée, en l'absence de toute multiplication bactérienne, on peut constater la diminution régulière du titre bactériophagique au cours de la première semaine, suivie d'un redressement rapide vers le dixième jour, puis d'une augmentation.

Pendant la période de diminution, le bactériophage se dissimule, soit à la surface, soit à l'intérieur des bactéries, d'où il peut être libéré, en partie, par la centrifugation ou par le chauffage à 56°.

(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur les Bactériophages.)

RECHERCHES SUR LA CINÉTIQUE DE LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE SÉRUM SUR LES VITESSES DE RÉACTION

par J. CHOUTEAU.

Poursuivant nos recherches sur les vitesses de réaction sérologiques, nous avons étudié l'influence de la quantité de sérum syphilitique sur ces vitesses. Cette question a été jusqu'ici l'objet de recherches statiques et qualitatives. La quantité de sérum introduite dans la réaction de Bordet-Wassermann varie d'une technique à l'autre, sans qu'aucune considération théorique préside à leur choix [Rubinstein (1)]. Ronchèse (2) seul a étudié cette action de façon précise et ne constate aucune différence lorsque les quantités de sérum suspect varient entre 0,5 et 0,02 c. c. ; il conclut « que la quantité de sérum suspect n'a aucune influence sur l'intensité de la réaction, si l'on évite l'action perturbatrice d'un complément étranger agissant par ses albumines banales ». Cet auteur explique cette indépendance en disant « que la sérine et la globuline sont antagonistes vis-à-vis de la réaction, un sérum étant positif dès que la globuline aurait un excès relatif d'activité suffisant ». La notion de réagine syphilitique correspondrait donc à ce rapport d'activité entre sérine et globuline, d'où son indépendance quelle que soit la prise d'essai.

Nous avons repris cette étude en appliquant la méthode d'évaluation de la positivité des sérums décrite avec H. Rocher (3) ; rappelons qu'elle consiste à effectuer une réaction à dilutions multiples d'antigène sur des quantités fixes de sérum.

Nous avons tout d'abord étudié le phénomène du point de vue statique, et pour cela nous avons effectué une série de réactions à dilutions multiples sur des quantités variables de sérum positif : 0,05 c. c., 0,1 c. c., 0,15 c. c. et 0,2 c. c., avec un temps de fixation de trente minutes. Les courbes d'hémolyse obtenues sont pratiquement confondues, montrant que la quantité de sérum n'a, dans ces conditions, aucune influence sur l'intensité de la fixation du complément. L'influence du volume total a été étudiée, d'autre part ; elle s'est montrée également négligeable.

Nous avons ensuite repris l'étude de ce phénomène du point de vue cinétique, en appliquant la méthode de détermination de la vitesse de réaction décrite par nous (4) et effectué une série de mesures sur

(1) RUBINSTEIN, *Traité pratique de sérologie et de séro-diagnostic*, Maloine, éditeur, Paris, 1932, 165.

(2) A. D. RONCHÈSE, *La réaction de Bordet-Wassermann pour le séro-diagnostic de la syphilis*, Masson, éditeur, Paris, 1919, 101.

(3) H. ROCHER et J. CHOUTEAU, ces *Annales*, 1941, 167, 299.

(4) J. CHOUTEAU, *C. R. Soc. de Biol.*, 1943, 137, 696.

les quantités de sérum précitées. Nous avons ainsi pour ces quantités de sérum et pour divers temps de fixation de zéro minute à soixante minutes obtenu une série de valeurs de la quantité $(a-x)$ d'antigène restant à transformer à chaque instant. En traçant une courbe (fig. 1) avec, en ordonnée, les valeurs de $(a-x)$ et en abscisse le temps, on observe une origine différente pour les deux courbes extrêmes (correspondant à 0,05 c. c. et 0,2 c. c. de sérum), mais ces courbes finissent par se rejoindre pour les temps compris entre trente minutes et une heure. Ces courbes montrent donc que les quantités initiales d'antigène réagissantes dépendent pour les temps courts de la quantité de sérum introduite. Mais cette différence baisse avec le temps et si l'étude est effectuée pour les temps classiques de fixation (trente minutes et une heure)

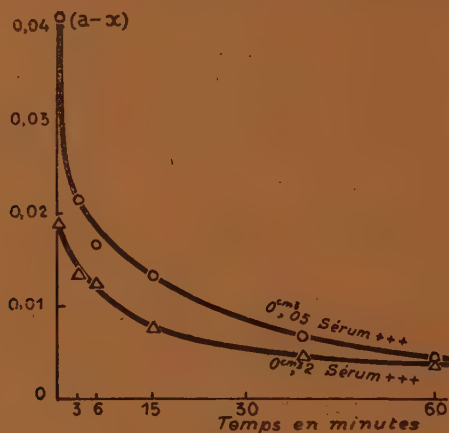


FIG. 1.

la quantité de sérum paraît sans influence, comme l'avait constaté Ronchèse (*loc. cit.*).

Nous avons enfin tracé les courbes (fig. 2) de vitesse correspondant à ces données avec, en ordonnée, le pourcentage d'antigène transformé $\frac{x}{a}$ et en abscisse le temps nécessaire à cette transformation.

On constate un abaissement de la vitesse avec l'augmentation de la quantité de sérum.

Il ressort de ces expériences : a) que l'augmentation de la quantité de sérum suspect semble sans influence sur la fixation du complément pour les temps compris entre trente minutes et une heure, mais pour les temps inférieurs on constate une différence diminuant avec le temps et s'annulant pratiquement à partir de trente minutes-une heure ; b) l'analyse cinétique vient préciser ces différences et montre une diminution de la vitesse avec l'augmentation de la quantité de sérum.

Ces faits ne sont pas en contradiction avec les expériences de Ronchèse effectuées dans la zone trente minutes à une heure, et les diffé-

rences observées peuvent s'expliquer simplement par un ralentissement de la vitesse de réaction dû à la surcharge en protéines banales du sérum (dont quelques-unes peuvent être anticomplémentaires). D'ailleurs on constate un abaissement de la vitesse, et non un accroissement correspondant à l'augmentation parallèle de la quantité de réagine. Ces recherches confirment donc, en les précisant, les travaux de Ronchèse (*loc. cit.*), et elles ne permettent pas de considérer la réagine syphilitique, intervenant dans la fixation du complément, comme un individu chimique, mais seulement plutôt, suivant l'hypothèse de Ronchèse, comme un rapport entre sérine et globuline, ou,

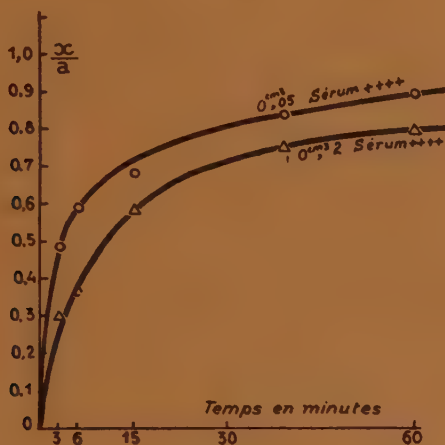


FIG. 2.

plus généralement, pensons-nous, entre protéines normales et pathologiques. Ces conclusions ne s'appliquent qu'à la réagine intervenant dans la réaction de fixation et n'excluent nullement la possibilité d'une réagine individualisée chimiquement pour d'autre type de réaction, floculation notamment (5).

Cette différence, d'ailleurs, serait en parfait accord avec les travaux de M^{me} Lourau (6), mettant en évidence une différence essentielle entre les deux anticorps. En effet, dans un champ électrique, l'électrophorèse est active sur l'anticorps intervenant dans les réactions de floculation et reste sans effet sur l'anticorps d'hémolyse.

(Institut Alfred-Fournier. Service de M. C. Levaditi.)

(5) Pallidine de Vernes, par exemple.

(6) Mme LOURAU-DESSUS, *Recherches sur la nature des anticorps*. Thèse. Presses universitaires de France, 1937.

EMPLOI DU PLASMA DE CHEVAL POUR LA CULTURE DES TISSUS

par E. LASFARGUES.

Un des plus gros écueils que l'expérimentateur voulant se livrer à la culture de tissus rencontre à la période actuelle est l'obtention d'une quantité suffisante d'un plasma convenant à ces cultures. Jusqu'à présent les méthodes classiques utilisaient le plasma de poulet, qui offrait les avantages d'un caillot ferme n'ayant que très peu tendance à la lyse, ainsi que d'excellentes qualités optiques. La « stabilisation » du plasma était souvent obtenue avec de l'héparine, produit dont la préparation dans les circonstances actuelles est difficile et d'un prix de revient élevé.

Profitant de notre présence dans un Institut de sérothérapie et grâce à la méthode du plasma-tyrode hypertonique de Villequez (1), que nous avons légèrement modifiée, nous avons pu préparer de grandes quantités de plasma, celui-ci étant obtenu par ponction aseptique de la jugulaire du cheval. L'appareillage et la technique tout particuliers qu'exige la récolte du sang de cheval font l'objet de la communication suivante et seront exposés par M. Nicol.

La solution minérale de tyrode que nous utilisons est préparée en deux temps à une concentration 10 fois supérieure à la normale :

Solution A (ou de réserve).

Chlorure de potassium.	2 g.
Chlorure de calcium.	2 g.
Chlorure de magnésium.	1 g.
Phosphate monocalcique.	0,5 g.
Eau distillée q. s.	100 c. c.

Distribuée en ampoules de 10 c. c., cette solution est stérilisée à l'autoclave à 120°, puis conservée à la glacière.

Solution B.

Solution A.	10 c. c.
Glucose.	1 g.
Chlorure de sodium.	8 g.
Eau distillée q. s.	100 c. c.

Cette solution, moins stable à cause du glucose, est préparée au fur et à mesure des besoins, répartie en ampoules de 5, 10 et 20 c. c. et stérilisée à l'autoclave à 110°.

Si nous recueillons le sang d'un cheval en présence de cette solution B, hypertonique, dans les proportions de 1 c. c. de solution saline pour 4 c. c. de sang, nous obtenons après centrifugation (cinq minutes

(1) VILLEQUEZ, *Biologie Médicale*, 1937, 27, 614.

à 3.000 tours) un plasma stabilisé parfaitement limpide, se conservant un mois à la glacière environ.

La prise en masse du plasma s'effectue facilement en rendant celui-ci à l'isotonie. Pour cela il suffit de diluer 1 partie de plasma-tyrode hypertonique dans 2 parties d'une solution de bicarbonate de soude à 1 p. 1.000 préalablement filtrée.

Nous préférons préparer, selon Borrel, une solution stérilisable à l'autoclave, de carbonate de sodium à 1 p. 1.000 que nous transformons en solution bicarbonatée au moment de l'emploi, par addition d'une quantité suffisante d'acide chlorhydrique titré à 10 p. 100.

Le coagulum, ferme et transparent, obtenu par cette méthode nous a donné toutes satisfactions. L'abondante prolifération des fibroblastes et les battements d'un cœur de cobaye embryonnaire nous ont prouvé la qualité du milieu. Cette méthode permet en outre d'opérer dans les conditions normales sans le secours de glace ou de récipients parafinés, ce qui n'était possible que par l'emploi de l'héparine.

Malgré la dilution du plasma au 1/3, indispensable par cette méthode, le coagulum est suffisamment ferme et la lyse est assez tardive. Des cultures comparatives en plasma homologue (cobayes) nous ont montré que la croissance était identique dans chaque milieu jusque vers le cinquième jour environ. Les fragments de tissus en plasma de cheval (plasma hétérologue) dégénèrent ensuite plus rapidement. Cependant, comme dans la majorité des cas, nous pratiquons des repiquages vers le deuxième ou troisième jour, nos cultures sont restées aussi abondantes qu'en plasma homologue. Nous opérons maintenant exclusivement en plasma de cheval, et ce milieu s'est révélé excellent.

Les avantages que nous offre cette méthode sont appréciables. Nous pouvons obtenir à volonté une quantité illimitée de plasma dont le prix de revient est modique. La technique pour la récolte du sang se trouve également très simplifiée et rendue relativement aisée.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

DISPOSITIF SIMPLE PERMETTANT D'EFFECTUER CHEZ LES GRANDS ANIMAUX LE PRÉLÈVEMENT ASEPTIQUE DU SANG DANS DES BUTS BACTÉRIOLOGIQUES

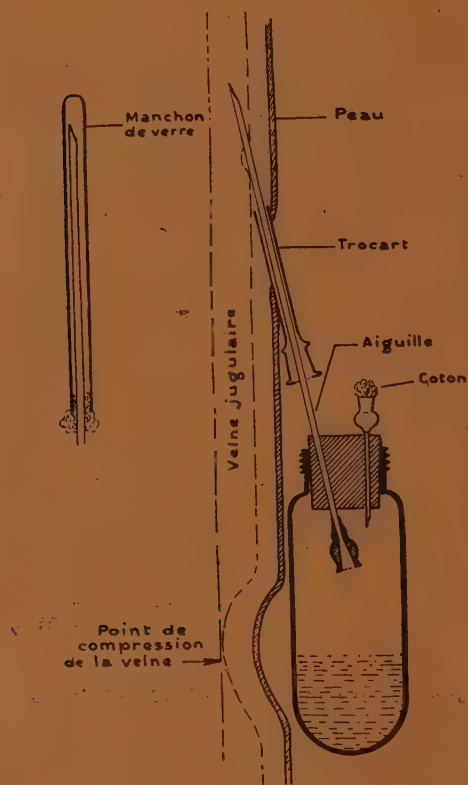
par Louis NICOL.

Lorsqu'on prélève du sang chez les grands animaux : cheval, bœuf, mouton, etc., dans des buts bactériologiques : hémoculture, préparation de plasma, etc., il n'est souvent pas aisé d'obtenir des prélèvements d'une stérilité parfaite, condition cependant indispensable. Les nombreux germes saprophytes de la peau de ces animaux sont difficiles à éliminer, même en prenant les mesures les plus rigoureuses de désinfection cutanée. En traversant la peau, l'aiguille arrache des débris

épidermiques souillés, qui sont ensuite entraînés par le flot de sang.

Nous étant trouvé devant cet écueil, lors de prélèvements destinés à la préparation de plasma aseptique, nous avons imaginé un dispositif très simple qui permet de l'éviter.

Une aiguille de 15 cm. de long et de 2 mm. de diamètre environ, du modèle habituellement utilisé pour les injections d'antigènes aux



chevaux, traverse de part en part un bouchon de caoutchouc. Pour rendre les manipulations plus aisées, elle le traverse obliquement, de telle façon que son extrémité soit en dehors du plan du récipient destiné à recevoir le sang. Une seconde aiguille, plus petite, traverse le bouchon, l'embout étant à la face supérieure de ce bouchon. Cette aiguille a pour but de permettre la sortie de l'air du flacon, au fur et à mesure de son emplissage. Le bouchon ainsi agencé est adapté au goulot du flacon dans lequel a été introduit à l'avance la solution anticoagulante ou le milieu, s'il s'agit d'une hémoculture. On coiffe la pointe de l'aiguille d'un manchon en verre, on bouche l'embout de la petite aiguille à l'aide d'un petit tampon de coton et on stérilise

l'ensemble de l'appareil après l'avoir entouré d'un capuchon de papier parchemin.

Technique. — 1° Après avoir coupé les poils au niveau de la limite du tiers supérieur et du tiers moyen de la gouttière jugulaire et après avoir désinfecté la région à la teinture d'iode, on fait une ponction de la peau à l'aide d'une lancette stérile.

2° A la faveur de la petite incision ainsi pratiquée on introduit parallèlement à la peau, tout en restant en position sous-cutanée, un trocart à saigner très court (4 à 5 cm. de long), mais de diamètre intérieur suffisant pour laisser passer librement l'aiguille de l'appareil.

3° A travers la lumière de ce trocart on ponctionne la veine et on recueille le sang. Dès le prélèvement terminé, on recoiffe l'aiguille de son manchon, puis au laboratoire, au-dessus du Bec Bunsen, on remplace le bouchon de caoutchouc, selon les cas, par un couvercle ou un tampon de coton, stérilisé à part.

NOTE DE LABORATOIRE

PRÉPARATION DU SILICO-GEL STÉRILE

par Y. T. TCHAN.

L'utilisation de la silice gélatineuse comme substratum de milieu solide a été introduite par Winogradsky vers 1893.

Les travaux de cet auteur (1) sur la flore microbienne du sol ont montré l'importance de ce support privé de toutes substances organiques. Ainsi, on a pu réaliser la culture sur un milieu solide de silice de microorganismes strictement autotrophes.

Winogradsky emploie sa méthode directe, qui n'exige pas une asepsie absolue. Cependant, un milieu stérile est désirable dans certains cas. Sans entrer dans les discussions sur la valeur de méthodes directes, nous sommes certains que la réalisation des plaques de silico-gel stérile rendra des services à tous les microbiologistes qui désirent substituer à la gélose un colloïde minéral.

Plusieurs auteurs ont tenté de réaliser le silico-gel stérile.

En 1925, Marc Souleyre (2) proposa une méthode rapide de préparation du silico-gel en éliminant la base du silicate de potasse sous forme de bitartrate de K insoluble. Cependant, le milieu préparé suivant la formule de cet auteur contient à son départ des ions PO_4 , SO_4 , K, tartriques.

Plus tard, Wahl (3), en 1938, indique une autre méthode de prépa-

(1) M. S. WINOGRADSKY, ces *Annales*, 1925, 39, 299 ; 1926, 40, 435 ; 1929, 43, 549 ; 1932, 48, 89 et 269. — M. S. WINOGRADSKY et H. WINOGRADSKY, ces *Annales*, 1933, 50, 350 et 1936, 56, 221.

(2) M. SOULEYRE, *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 93, 306.

(3) R. WAHL, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 854.

ration ; elle consiste à mélanger l'acide chlorhydrique, le silicate et le milieu de culture dans des proportions convenables et ayant fait la prise en masse, à tyndalliser à 65° C. Ce milieu renferme des ions Cl et Na dont on ne peut se débarrasser.

A l'étranger, E. Loichinger (4) propose de neutraliser le silicate par l'acide phosphorique. On mélange d'abord le milieu nutritif et l'acide phosphorique avant de couler la plaque, on ajoute le silicate et on coule immédiatement. Toutes ces opérations sont exécutées avec des solutions stériles.

D. Müller et Fr. Holm (5) indiquent de stériliser à l'autoclave le gel précédemment lavé en maintenant à l'aide d'un tampon le pH au voisinage de la neutralité. L'imprégnation se fait à 40°-50° avec un disque de papier filtre fixé dans le couvercle.

Toutes ces méthodes présentent le même inconvénient, ces milieux contenant une quantité plus ou moins importante d'ions, ce qui limite leurs applications.

De notre côté, nous avons essayé de réaliser une méthode de préparation de silico-gel stérile.

Deux conditions sont essentielles :

1° Être maître absolu de la composition du milieu ;

2° Assurer sa stérilité parfaite.

Pour remplir ces deux conditions, il faut utiliser le silico-gel lavé et stérile, c'est-à-dire débarrassé de tous les sels solubles et des micro-organismes. On l'imprègne avec un milieu de composition choisie.

La stérilisation du silico-gel à l'autoclave est impossible. La tyndallisation à 65° C. à vingt-quatre heures, à quarante-huit heures d'intervalle ne donne pas une stérilité parfaite. Si on augmente la température, le gel se ramollit, et très souvent la surface du gel est dérangée. Nous avons eu recours à une méthode d'irradiation. Parmi les rayons cytolytiques, nous avons choisi l'ultra-violet qui est d'un emploi facile, l'appareillage étant accessible à tous les laboratoires. Son pouvoir cytolytique est très élevé.

On sait que les microorganismes sont plus ou moins résistants selon les espèces, les stades de leur vie et les conditions d'application de l'ultra-violet [E. Roux, Marshall-Ward, Finsen, G. Dreyer et H. Jansen, Schmidt-Nielsen, Victor Henri et M^{lle} Cernovodeanu, R. O. Prudhomme] (6).

Voici les conditions particulières de notre technique :

1° Préparation des plaques ;

2° Stérilisation des plaques ;

3° Imprégnation des plaques.

(4) E. LOICHINGER, *Wochenschr. für Brauerei*, 1939, 56, 36 ; *Ann. Ferment.*, 1939, 5, 188.

(5) D. MÜLLER et Fr. HOLM, *Zentralbl. Bakt.*, II, 1942, 405, 131.

(6) E. ROUX, ces *Annales*, 1887, 1, 445. — MARSHALL WARD, *Phil. Transact. Roy. Soc.*, 1893, 961. — FINSEN, *Ueber die Bedeutung der chemischen Strahlen des Lichtes für Medizin und Biologie*, Leipzig, 1889. — G. DREYER et H. JANSEN, *C. R. Acad. Sci.*, 1894, 119, 234. — SCHMIDT-NIELSEN, *Beiträge Chem. Physiol.*, 1904, 5, 355. — V. HENRI et M^{lle} CERNOVODEANU, *C. R. Acad. Sci.*, 1910, 150, 52 et 549. — V. HENRI (M. et M^{me}), *C. R. Acad. Sci.*, 1910, 150, 724. — R. O. PRUDHOMME, *Ann. Ferment.*, 1938, 4, 103.

1° Préparation des plaques : selon Winogradsky (1).

2° Stérilisation des plaques.

Production de l'ultra-violet : nous avons utilisé la lampe S-31 de la société Gallois et C^{ie}. La distance entre la source et les plaques est de 35 cm. Nous avons supprimé le filtre. La partie du spectre visible ne nous gênant pas nous délimite au contraire la zone de l'ultra-violet. Nos essais ont été faits sur des plaques imprégnées et sur des plaques lavées.

Avant de soumettre les plaques à la stérilisation, on détache à l'aide d'un couteau flambé un carré de gel de 2 cmq., qui constitue le témoin. Puis on détache la même quantité de gel de temps en temps. Ces morceaux de gel sont écrasés et ensemencés sur un milieu nutritif (gélose au lait digéré à la papaïne de Guittoneau et Chevalier [7]). Après cinq jours à 37° C on compte le nombre de colonies.

Les plaques imprégnées demandent un temps d'exposition beaucoup plus long pour être stériles. L'effet photochimique de l'ultra-violet constitue un inconvénient grave. Cela suffit pour que nous rejetions cette méthode des plaques imprégnées.

EXPÉRIENCE. — Plaque imprégnée. Intensité du rayon (Position I).

Temps d'exposition .	Témoin.	10'	20'	30'	40'	60'
Nombre de colonies .	Incomptable.	Incomptable.	+ 500	250	320	3

Pour les plaques simplement lavées, le temps d'exposition doit être supérieur à trente minutes.

EXPÉRIENCE. — Plaque lavée. Intensité du rayon (Position I).

Temps d'exposition .	Témoin.	10'	20'	30'	45'	60'
Nombre de colonies .	Incomptable.	Incomptable.	8	0	0	0

Une fois la stérilisation terminée, couvrir avec un couvercle stérile.

3° Imprégnation des plaques.

Tous ceux qui ont travaillé avec les plaques de silico-gel connaissent la grande quantité d'eau de condensation qui est une source de contamination grave. Nous utilisons du papier filtre pour l'absorber. Voici comment on prépare les couvercles munis de papier filtre :

On prépare des rondelles de papier filtre dont le diamètre est légèrement supérieur au diamètre de la boîte. On en coud 5 ou 6 ensemble. On les colle à l'intérieur du couvercle avec de la gélose. On stérilise à l'autoclave la boîte vide ainsi couverte.

(7) G. GUITTONEAU et R. CHEVALIER, *Ann. Technologie agricole*, 1940, 3.

Imprégnation proprement dite. — Chauffer les boîtes stériles couvertes dans une étuve ordinaire jusqu'à 50° C, ainsi que le milieu stérile à imprégner. On le coule aseptiquement dans les boîtes. La quantité du milieu doit être aux environs de 1 c. c. pour une boîte de 10 cm. de diamètre et 5 c. c. pour une boîte de 20 cm. de diamètre. On enlève son couvercle et la transporte dans une autre boîte stérile plus grande. Les jointures sont bouchées au coton (voir fig.) [Le coton sert à filtrer l'air quand on ouvre l'exsiccateur.]

On place le tout dans un exsiccateur, on fait le vide jusqu'à 65 mm. Hg et on porte à 65° C.

Le séchage dure environ une heure. Une fois séchée, on retire la boîte imprégnée et on la couvre avec un couvercle muni de papier filtre.

Toutes ces opérations sont faites avec les précautions d'asepsie.

Cependant, on peut opérer d'une façon plus simple avec autant de succès. Il suffit de sécher les boîtes dans une étuve stérilisée au préalable. Laisser monter la température de l'étuve jusqu'à 180° C et la maintenir pendant une heure. Laisser descendre jusqu'à 50-60° C. Placer les boîtes dans l'étuve, enlever les couvercles. Sécher les boîtes. Le séchage s'effectue rapidement. Avant de les sortir, on les couvre avec des couvercles munis de papier filtre.

Pour éprouver leur stérilité, on détache un peu de gel et on l'ensemence sur de la gélose au lait digéré à la papaine.

N. B. — Les mains et les bras de l'opérateur doivent être désinfectés à l'alcool.

Conclusion. — Par les procédés indiqués, nous avons pu réaliser des boîtes de silico-gel stérile. Cette technique permet de se servir de la silice gélatineuse comme support solide de n'importe quel milieu.

Nous remercions M. le docteur Bretey, qui nous a suggéré la stérilisation à l'U. V.

(Travail exécuté sous la direction de MM. GUITTONNEAU et CHEVALIER, à l'Ecole nationale d'Agriculture de Grignon et de l'Institut agronomique de Paris.)

Paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* les communications suivantes :

Séance du 13 avril.

Différences physiologiques entre deux variantes S et R de « *Proteus vulgaris* », par M^{lle} Madeleine MOREL.

Précisions sur l'inactivation des bactériophages par les rayons ultraviolets, par R. LATARJET et R. WAHL.

Séance du 4 mai.

Recherches sur les nucléoprotéides des microorganismes. III. Sur les constituants colloïdaux cédés par la levure vivante au milieu ambiant, par R. VENDRELY et R. SARCIRON.

Lésions pathologiques des glandes salivaires du mulot (« *Apo-demus sylvaticus* » L.), par A. RAYNAUD et J. RAYNAUD.

Sur certains caractères de la croissance en voile des bacilles acido-résistants, par J. BRETEY, J. BROWAEYS et D. DERVICHIAN.

Séance du 1^{er} juin 1944.

Présidence de M. NOEL BERNARD.

COMMUNICATIONS

DIAGNOSTIC DES ESPÈCES *SPHEROPHORUS NECROPHORUS* ET *SPHEROPHORUS FUNDULIFORMIS*

par A.-R. PRÉVOT.

La parenté indéniable qui existe entre les deux espèces *funduliformis* et *necrophorus* a été signalée pour la première fois en Europe en 1938 dans notre essai de classification des anaérobies (1). Nous avons proposé en effet de les réunir dans le même genre : *Spherophorus* en raison de leurs caractères morphologiques communs, qui sont des caractères d'Actinomycètes (polymorphisme : bâtonnets, navettes, filaments, formes renflées en massues et sphéroïdes libres, ramifications, granulations métachromatiques). Ce genre est le type de la famille des *Spherophoraceæ* ou Actinomycètes Gram-négatifs, dont les autres genres sont *Spheroциllus*, *Fusiformis*, *Fusocillus* et *Leptotrichia*.

Contrairement à notre conception, Dack et ses collaborateurs : Heinz Dragstedt, Johnson, Mc Cullough et Kirsner, ont déduit d'une suite de recherches poursuivies aux Etats-Unis (2) que les espèces *funduliformis* et *necrophorus* sont identiques ; cette affirmation est fondée sur le fait que des souches de *necrophorus* isolées de la colite ulcéreuse de l'homme ont été jugées identiques d'une part à l'agent de la nécrobacilliose des bovidés et d'autre part à des souches de *funduliformis* isolées de syndromes septicémiques et nécrotiques de l'homme. Cette identification, si elle était justifiée, aurait pour conséquence la disparition de l'espèce *funduliformis* Hallé 1898, décrite postérieurement à l'espèce *necrophorus* Schmorl 1891 et poserait des problèmes inattendus tels que : origine commune de la nécrobacilliose animale et des septicémies nécrotiques humaines, réservoirs de virus communs, prophylaxie et thérapeutique similaires.

(1) A.-R. PRÉVOT. Ces Annales, 1938, 60, 285.

(2) DACK, HEINZ, DRAGSTEDT, Arch. Surgery, 1935, 31, 223 ; J. Am. Med. Ass., 1936, 106, 7 ; J. inf. Dis., 1937, 60, 335 ; les mêmes avec JOHNSON et MC CULLOUGH, J. inf. Dis., 1938, 62, 169 et avec KIRSNER : J. inf. Dis. 1939, 65, 200.

En 1939 nous avons entrepris des recherches avec E. Kirchheiner en vue d'élucider ce problème (3). Or le métabolisme de ces 2 espèces est tellement semblable (attaque pondérale comparable des glucides, type fermentaire identique, métabolisme azoté sensiblement pareil) qu'il est impossible de trouver de ce côté un élément de différenciation. Bien plus, nous avons pu mettre en évidence dans chacune de ces espèces, un antigène glucido-lipidique toxique, origine de leur pouvoir pathogène très marqué, et les tests immunologiques de précipitation et d'agglutination nous ont montré la communauté de ces antigènes. Nous n'avons donc pu que renforcer la thèse de la parenté de ces deux espèces.

Cependant, restant persuadé qu'il s'agit bien de deux espèces différentes quoique très voisines, nous avons continué à rechercher des éléments de distinction. Nous résumons dans le tableau ci-après les éléments du diagnostic de ces espèces.

Ce faisceau de caractères différentiels permet d'infirmer la thèse de l'identité soutenue par les auteurs américains ; *Sph. necrophorus* reste l'agent étiologique d'une des plus grandes enzooties mondiales : la nécrobacillose des herbivores, alors que *Sph. funduliformis* est l'agent de maladies humaines très graves, souvent mortelles débutant par une angine aiguë et évoluant comme une septicémie à métastases nécrotiques. Néanmoins ces espèces sont très voisines, présentent de nombreux caractères communs, comme on voit fréquemment des exemples semblables de parenté dans d'autres groupes pathogènes anaérobies : Groupe de l'œdème malin-charbon symptomatique : *Cl. septicum*, agent pathogène surtout pour l'homme, *Cl. chauvæi*, agent pathogène exclusivement animal ; groupe du phlegmon gazeux-entérotoxémie ovine : *W. perfringens*, agent pathogène surtout pour l'homme ; *W. agni*, agent pathogène ovin ; *Cl. botulinum*, type A et B à la fois humains et bovins, type C aviaire, type D équin, type E pisciaire ; *Cl. œdematiens* et *Cl. bellonensis* ; *Cl. sordellii* et *Cl. bifermentans*.

	<i>S. necrophorus</i>	<i>S. funduliformis</i>
Habitat	Intestin des herbivores.	Cavités naturelles de l'homme.
Morphologie.	Surtout formes filament, avec granulations métachromatiques et sphéroïdes libres.	Polymorphisme plus marqué, surtout filaments avec renflements en massues et sphéroïdes libres.
Cultures.	Trouble le bouillon. Coagule rapidement le lait. Non empêché par la bile.	Ne trouble pas le bouillon. Coagule lentement le lait. Empêché par la bile.
Pouvoir pathogène.	Nécrobacillose des herbivores. Atteinte spontanée de l'homme exceptionnelle. Exotoxine présente.	Angines aiguës humaines, suivies de septicémies graves, souvent mortelles avec métastases nécrotiques. Atteinte spontanée des animaux exceptionnelle. Exotoxine absente.
Réaction de Laporte et Brocard.	Négative avec le sérum anti- <i>funduliformis</i> .	Positive avec le sérum anti- <i>funduliformis</i> .

(3) A.-R. PRÉVOT et E. KIRCHHEINER. C. R. Ac. Sci. 1939, 209, 182 et KIRCHHEINER, ces Annales 1940, 64, 238.

Il est du plus haut intérêt de rechercher les parentés des espèces proposées, mais il serait dangereux d'identifier par principe les espèces présentant des caractères communs.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies.)

SUR LA COEXISTENCE POSSIBLE DES ANTIGÈNES COMPLETS ET DES HAPTÈNES LIBRES CHEZ LES COLIBACILLES ET CHEZ D'AUTRES BACTÉRIES VOISINES

par A. BOIVIN et Y. LEHOULT.

Lorsqu'on vient de les isoler des urines des pyélonéphritiques ou des matières fécales des sujets normaux, *certain*s colibacilles donnent sur gélose des cultures offrant un aspect « muqueux » caractéristique. Tantôt ces germes ne montrent pas de capsule morphologiquement différenciée, tantôt ils présentent une capsule plus ou moins nette. Ils sont immobiles. Au cours des passages successifs sur gélose ou sur bouillon, il arrive qu'on voie une souche muqueuse, primitivement bien homogène, donner naissance à trois types de colonies distinctes :

- a) des colonies régulières, lisses et opaques, auxquelles correspondent des cultures franchement muqueuses : c'est la forme originelle ou forme S muqueuse ;
- b) des colonies régulières, lisses et translucides, auxquelles correspondent des cultures non muqueuses : variante S non muqueuse ;
- c) des colonies irrégulières et rugueuses : variante R.

Par la technique à l'acide trichloracétique, on peut obtenir des préparations antigéniques à partir de a et de b, mais non de c. Toutefois, les antigènes provenant de a et de b, s'ils semblent bien posséder la même spécificité sérologique, se séparent l'un de l'autre à un triple point de vue :

1° Le rendement de l'extraction est beaucoup plus grand pour a que pour b ;

2° L'antigène de a, de composition assez variable d'une préparation à l'autre, est bien moins riche en éléments lipidiques et bien plus riche en éléments glucidiques que l'antigène de b, de composition sensiblement constante ;

3° A l'unité de poids, l'antigène de a est bien moins toxique que l'antigène de b.

Par dialyse prolongée à travers du collodion de haute perméabilité (collodion acétique à 1 p. 100, armé par un support de cellulose), on voit l'antigène de a se rapprocher progressivement et à tous points de vue de l'antigène de b. Tandis que l'antigène de b ne perd rien à la dialyse, même à travers du collodion de haute perméabilité, celui de a laisse lentement passer un matériel qui, par ses propriétés chimiques et biochimiques, s'avère identique à l'haptène glucidique qu'on peut obtenir par décomposition ménagée de l'antigène de b (chauffage en milieu acétique).

L'ensemble de tous ces faits ne laisse guère possible qu'une seule interprétation : la forme originelle renferme, à côté de l'antigène complet du type usuel, une grosse surcharge d'haptène libre, alors que la variante S non muqueuse contient seulement de l'antigène. Il faut ajouter que les filtrats des jeunes cultures sur bouillon de b ne montrent pratiquement ni antigène ni haptène, pendant que les filtrats correspondants de a renferment en abondance de l'haptène et pas (ou presque pas...) d'antigène. On peut donc penser qu'un gros excès d'haptène glucidique est élaboré par les cellules pleinement vivantes de a pour être — au moins en partie — déversé dans le milieu ambiant. Quant à l'antigène, il semble, selon la règle, ne se libérer en quantités notables qu'à partir du moment où les bactéries sont mortes et entrent en autolyse.

L'état muqueux est exceptionnel chez les colibacilles qu'on vient d'isoler. Nous en avons noté un exemple dès 1936 (1) et en avons rencontré plusieurs autres depuis lors. Les diverses souches muqueuses se répartissent dans les types sérologiques différents. Usuellement, les souches non muqueuses à l'isolement demeurent non muqueuses à travers les repiquages successifs. Quelquefois pourtant — nous en avons eu deux exemples — une souche primitivement non muqueuse acquiert la propriété d'élaborer un excès d'haptène glucidique libre et devient muqueuse.

Il nous a été donné de rencontrer la même dissociation, en forme S muqueuse (forme originelle), forme S non muqueuse et forme R chez une souche de pneumobacille (type B) que nous avons longuement suivie. Trois autres souches de pneumobacille (dont une appartenant également au type B) ne nous ont, par contre, rien montré de tel, les bactéries ayant gardé leur aspect muqueux usuel ou n'ayant donné que la variante R. Tout porte à penser que, chez le pneumobacille, la capsule est constituée par le polysaccharide libre.

Si les pneumobacilles méritent de former un groupe particulier, à cause de leur habitat particulier et de leur pouvoir pathogène spécial, ils ne s'en rapprochent pas moins des colibacilles par l'ensemble de leurs propriétés biochimiques. Les colibacilles muqueux font transition entre les pneumobacilles toujours muqueux et les colibacilles typiques, non muqueux. Les pneumobacilles apparaissent ainsi comme étant des formes essentiellement spécialisées par leur pouvoir pathogène particulier, dans l'immense groupe de bactéries renfermant les colibacilles et aussi tout ce qui gravite autour des colibacilles (*Salmonella* mobiles et dysentériques immobiles), groupe qui mérite le qualificatif d'« entérique » par suite de l'habitat usuel de la grande majorité de ses représentants, pathogènes et non pathogènes.

Les faits et les conceptions que nous venons d'exposer nous semblent présenter quelque intérêt en ce qui concerne d'une part la classification des germes et d'autre part la signification de la capsule des bactéries, du moins des bactéries à « Gram-négatif ».

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

(1) C. R. Acad. Sci., 1936, 203, 694.

Le Gérant : G. MASSON.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937 à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

Elle se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association.

Art. 2. — Elle est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les branches de la Science microbiologique.

Art. 3. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de Microbiologie (Microbiologie, Pathologie infectieuse, Immunologie, Chimiothérapie, Cancérologie), ou ayant publié des travaux de Microbiologie.

.....
Art. 9. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataires un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

Les membres français de l'Association constituent *ipso facto* et de plein droit, la SECTION FRANÇAISE de l'ASSOCIATION INTERNATIONALE DE MICROBIOLOGIE.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, *le premier jeudi de chaque mois* (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *ne varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant :

nom de l'auteur, titre du périodique (en abrégé et en italiques), année de publication, tome (en chiffres arabes gras), page. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms des périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séances du 13 avril, du 4 mai et du 1^{er} Juin 1944.

SOMMAIRE

Réaction d'allergie tuberculinique et acide gras α - α disubstitués, par JEAN PARAF et JEAN DESBORDES.	297
Relations entre l'insolubilité de la substance granulaire du bacille de Koch et les aspects principaux de la réaction de l'organisme à l'infection tuberculeuse, par R. LAPORTE	300
Comportement du bactériophage au cours de son développement dans l'eau de Seine autoclavée en l'absence de multiplication bactérienne par A. GUELIN.	303
Recherches sur la cinétique de la réaction de Bordet-Wassermann; influence de la quantité de sérum sur les vitesses de réaction, par J. CROUTEAU.	307
Emploi du plasma de cheval pour la culture des tissus, par E. LASFARGUES.	310
Dispositif simple permettant d'effectuer chez les grands animaux le prélèvement aseptique du sang dans des buts bactériologiques, par Louis NICOL.	301
Préparation du silico-gel stérile, par Y. T. TCHAN.	313
Diagnostic des espèces <i>Sperophorus necrophorus</i> et <i>Sperophorus funduliformis</i> , par A.-R. PRÉVOT.	317
Sur la coexistence possible des antigènes complets et des haptènes libres chez les colibacilles et chez d'autres bactéries voisines, par A. BOIVIN et Y. LEHOULT.	319

Dépôt légal. — 1945. — 3^e Trimestre. — Numéro d'ordre 69. — Masson et C^{ie}, édit., Paris.
Imprimé par l'Anc^{ne} Imp^{ie} de la Cour d'Appel, 1, r. Cassette, à Paris (France).

Published in France.

RECEIVED
OCT - 8 1945